

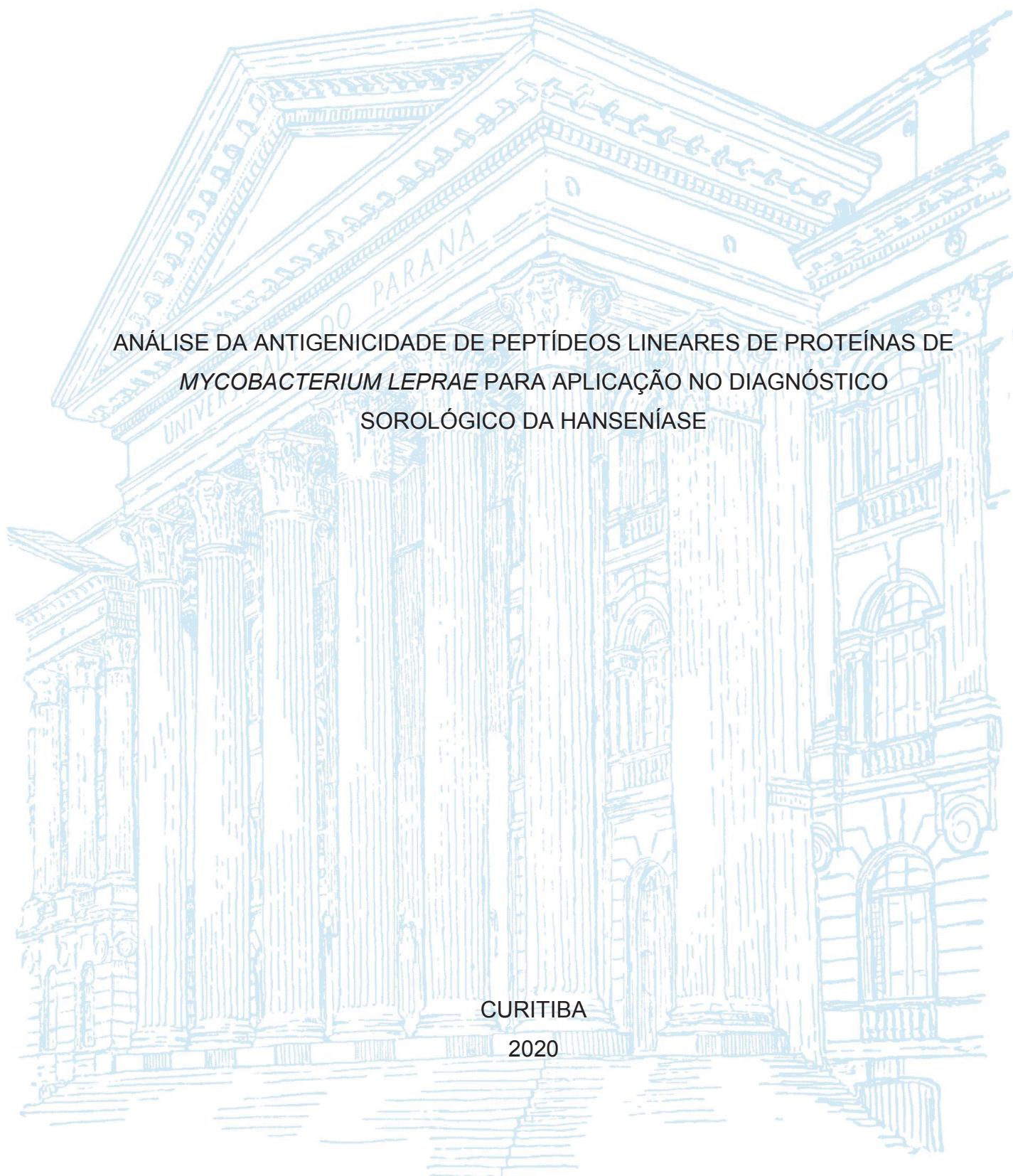
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO ARAUJO SOARES

ANÁLISE DA ANTIGENICIDADE DE PEPTÍDEOS LINEARES DE PROTEÍNAS DE
MYCOBACTERIUM LEPRAE PARA APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA HANSENÍASE

CURITIBA

2020



BRUNO ARAUJO SOARES

ANÁLISE DA ANTIGENICIDADE DE PEPTÍDEOS LINEARES DE PROTEÍNAS DE
MYCOBACTERIUM LEPRAE PARA APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO
SOROLÓGICO DA HANSENÍASE

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Ferreira de Moura

CURITIBA

2020

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

S676a Soares, Bruno Araujo
 Análise da antigenicidade de peptídeos lineares de proteínas de *mycobacterium leprae*
 para aplicação no diagnóstico sorológico da hanseníase [recurso eletrônico] Bruno Araujo
 Soares. – Curitiba, 2020.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2020.

Orientadora: Juliana Ferreira de Moura.

1. Hanseníase. 2. Sorodiagnóstico. 3. Peptídeos. I. Universidade Federal do Paraná. II.
Moura, Juliana Ferreira de. III. Título.

CDD: 614.546

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA - 40001016036P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **BRUNO ARAUJO SOARES** intitulada: **Análise da antigenicidade de peptídeos lineares de proteínas de *Mycobacterium leprae* para aplicação no diagnóstico sorológico da hanseníase**, sob orientação da Profa. Dra. JULIANA FERREIRA DE MOURA, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

01/04/2020 19:37:02.0

JULIANA FERREIRA DE MOURA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/04/2020 10:54:41.0

RICARDO ANDREZ MACHADO DE AVILA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE)

Assinatura Eletrônica

01/04/2020 19:40:45.0

HELENA REGINA SALOME D ESPINDULA

Avaliador Externo (PONTIFICA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

Dedico este trabalho a meu avô, Cezar Octavio França de Araujo.
Atravessar o Rubicão será mais difícil sem o senhor, um dia nos reencontraremos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais, Belisario e Marcia, e meu irmão, Pedro, que mesmo sem compreender exatamente essa tal “biotecnologia” sempre me deram todo o suporte, amor e carinho necessários para que eu pudesse concluir mais este desafio.

Agradeço à minha namorada, Letícia, por todo o apoio, conselhos e companheirismo nos momentos mais difíceis, até as fases mais felizes desta minha jornada.

Agradeço à minha orientadora, a Profa. Dra. Juliana Ferreira por toda a orientação, pelos ensinamentos e oportunidade em contribuir para este trabalho tão importante.

Agradeço às minhas colegas e amigas de laboratório, Isabella, Bianca, Martina e Bruna pelas conversas, conselhos, ajudas e risadas.

Agradeço à Profa. Dra. Larissa Alvarenga e a Profa. Dra. Alessandra Becker pelos conselhos e contribuições a este trabalho.

Agradeço à todas as pessoas não nominalmente citadas, mas que contribuíram diretamente ou indiretamente com esta dissertação.

RESUMO

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pela infecção do bacilo *Mycobacterium leprae*. Embora inúmeros avanços tenham ocorrido em direção ao combate da doença, a transmissão do *M. leprae* continua ativa e centenas de milhares de pessoas são diagnosticadas anualmente com hanseníase. O desenvolvimento de técnicas diagnósticas mais sensíveis e específicas é fundamental para o estabelecimento de estratégias de vigilância e monitoramento mais eficientes para o controle da hanseníase. Assim, o presente estudo utilizou técnicas de mapeamento de epitopos para identificar novos antígenos do *M. leprae* para uso em testes de diagnóstico sorológico. Dois novos peptídeos, os Peptídeos 1 e 2, foram identificados, acoplados a uma proteína carreadora e caracterizados por ensaios imunquímicos quanto ao seu potencial diagnóstico. Os dois peptídeos foram capazes de ser reconhecidos de forma estatisticamente diferente ($p < 0,05$) pelos soros de indivíduos hansenianos, em comparação a soros de voluntários saudáveis e tuberculosos por ensaios de ELISA e de Dot blotting. As porcentagens de detecção seguiram conforme o espectro imunológico dos indivíduos, sendo o Peptídeo 1 reconhecido por 81,82% dos pacientes MB e 41,18% dos PB, enquanto o Peptídeo 2 reagiu com 80% e 58,33% dos MB e PB, respectivamente. Além disso, a associação dos dois peptídeos em um mesmo teste aprimorou a performance de distinção entre doentes e saudáveis. Por último, um ELISA de competição demonstrou que indivíduos hansenianos produzem anticorpos específicos contra os dois peptídeos. Estes resultados apontam para a descoberta de dois novos antígenos com capacidade de serem reconhecidos por anticorpos de indivíduos hansenianos e que podem ser empregados para o desenvolvimento de plataformas mais sensíveis e específicas para o diagnóstico sorológico da hanseníase.

Palavras-chave: Hanseníase. *Mycobacterium leprae*. Mapeamento de epitopos. Diagnóstico sorológico. Peptídeos.

ABSTRACT

Leprosy is a chronic infectious disease caused by the *Mycobacterium leprae* bacillus. Although great advances have been achieved forward leprosy control, *M. leprae* transmission is still occurring and hundreds of thousands of people are newly diagnosed every year. The development of more sensible e specific diagnostic techniques is essential for establishing efficient monitoring and vigilance strategies aiming for leprosy elimination. Thus, the present work employed epitope mapping approaches to identify new *M. leprae* antigens to serological diagnosis. Two new peptides, called Peptides 1 and 2, were identified, coupled to a carrier protein, and evaluated by immunochemical assays for characterizing their diagnosis potential. Both peptides were recognized statistically different ($p < 0,05$) by leprosy serum, compared to healthy and tuberculosis controls in ELISA and Dot blotting assays. Recognition patterns were in agreement with the disease spectrum as Peptide 1 was recognized by 81,82% of MB and 41,18% of PB, while Peptide 2 reacted with 80% and 58,33% of MB and PB, respectively. Combining Peptides 1 and 2 in the same ELISA test was able to enhance the distinction between leprosy and healthy individuals. A final competitive ELISA experiment demonstrated the production of specific antibodies by leprosy individuals against both peptides. Therefore, two new antigens capable of being recognized by leprosy antibodies were identified and proved to be applicable for the development of more sensible and specific serological diagnostic platforms for leprosy.

Keywords: Leprosy. *Mycobacterium leprae*. Epitope mapping. Serologic diagnosis. Peptides.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição global do número de novos casos de hanseníase em 2018	21
FIGURA 2 – Classificação do espectro hanseniano de acordo com a divisão clássica, estabelecida por Ridley e Jopling (1966), e conforme classificação operacional	23
FIGURA 3 – Resposta imunológica dicotômica desenvolvida pelo espectro hanseniano em função da infecção pelo patógeno <i>M. leprae</i>	24
FIGURA 4 – Membranas de celulose após a síntese de sequências peptídicas de proteínas selecionadas de <i>M. leprae</i>	37
FIGURA 5 – Reatividade das Membranas 1 e 2 frente à apenas o anticorpo secundário anti-IgM humana, acoplado a peroxidase	47
FIGURA 6 – Reatividade das Membranas 1 e 2 frente à 25 µg.mL ⁻¹ de IgM precipitada a partir de <i>pool</i> de soros saudáveis	48
FIGURA 7 – Reatividade das Membranas 1 e 2 frente à 25 µg.mL ⁻¹ de IgM precipitada a partir de <i>pool</i> de soros hansenianos.....	48
FIGURA 8 – Reatividade dos peptídeos das proteínas ML2055 e ML2028 frente ao anticorpo anti-IgG humana-HRP a diluição de 1:120.000	50
FIGURA 9 – Reatividade dos <i>spots</i> das proteínas ML2055 e ML2028 após ensaio frente aos anticorpos do tipo IgG de pacientes hansenianos (DE SANTANA, 2017), seguido de análise de densitometria	51
FIGURA 10 – Ensaio de ELISA indireto para o Peptídeo 1 conjugado ao KLH	55
FIGURA 11 – Ensaio de ELISA indireto para o Peptídeo 2 conjugado ao KLH	55
FIGURA 12 – Ensaio de ELISA e curvas ROC geradas para o Peptídeo 1 ao dividir o grupo de pacientes hansenianos entre PB e MB	57
FIGURA 13 – Ensaio de ELISA e curvas ROC geradas para o Peptídeo 2 ao dividir o grupo de pacientes hansenianos entre PB e MB	58
FIGURA 14 – Ensaio de ELISA indireto associando os Peptídeos 1 e 2 conjugados ao KLH	61
FIGURA 15 – Variação da reatividade do <i>pool</i> de soros hansenianos em ensaio de ELISA de competição.....	63
FIGURA 16 – Porcentagem de inibição da interação dos Peptídeos 1 e 2, acoplados ao KLH, com o <i>pool</i> de soros hansenianos, a diluição de 1:1000, pré-	

incubados com as formas livres dos Peptídeos 1 e 2 e de um peptídeo inespecífico	64
FIGURA 17 – Coloração por reagente de Ponceau das estruturas proteicas imobilizadas sobre membranas de PVDF	65
FIGURA 18 – Reatividade do Peptídeo 1 conjugado ao KLH em ensaio de Dot blotting	66
FIGURA 19 – Reatividade do Peptídeo 2 conjugado ao KLH em ensaio de Dot blotting	67
FIGURA 20 – Fluxograma das etapas de seleção de epitopos para receptores de células T através de mapeamento <i>in silico</i> das proteínas ML0286, ML0405, ML2028, ML2038, ML2055 e ML2331 de <i>M. leprae</i>	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Parâmetros do potencial dos Peptídeos 1 e 2 para o diagnóstico da hanseníase por método de ELISA indireto.....	56
TABELA 2 – Parâmetros do potencial dos Peptídeos 1 e 2 para o diagnóstico de indivíduos PB e MB por método de ELISA indireto	59
TABELA 3 – Comparação do perfil de reconhecimento dos Peptídeos 1 e 2 por soros de pacientes MB e PB em relação a outros antígenos de <i>M. leprae</i> descritos pela literatura	60
TABELA 4 – Parâmetros do potencial da associação dos Peptídeos 1 e 2 para o diagnóstico da hanseníase por método de ELISA indireto.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag85B	- Antígeno 85B
BB	- Boderline boderline
BCR	- Receptores de células B
BL	- Boderline lepromatosa
BSA	- Albumina bovina sérica
BT	- Boderline tuberculoide
CN	- Controle negativo
E-VALUE	- Expected value
FGF-b	- Fator de crescimento básico de fibroblasto
GRAVY	- Grand Average of Hydropathy
HLA	- Antígeno leucocitário humano
HSA	- Albumina humana sérica
IFN- γ	- Interferon- γ
IgA	- Imunoglobulina A
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IL-1 β	- Interleucina-1 β
IL-2	- Interleucina-2
IL-4	- Interleucina-4
IL-10	- Interleucina-10
IL-12	- Interleucina-12
IL-17	- Interleucina-17
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível
IP-10	- Proteína 10 induzida por interferon γ
KLH	- Keyhole limpet hemocyanin
LAM	- Lipoarabinomanana
LL	- Hanseníase lepromatosa
MB	- Multibacilar(es)
<i>M. leprae</i>	- <i>Mycobacterium leprae</i>
NLR	- Receptores NOD-like
OPD	- o-fenilenodiamina
PCR	- Reação em cadeia da polimerase

PB	- Paucibacilar(es)
PGL-I	- Glicolípídeo fenólico I
PVDF	- Fluoreto de polivinilideno
TB	- Tuberculoso(s)
TBS-T	- TBS-Tween 0,1%
TCR	- Receptores de células T
TGF- β	- Fator de crescimento transformador β
Th1	- Linfócito T CD4 ⁺ helper 1
Th2	- Linfócito T CD4 ⁺ helper 2
Th17	- Linfócito T CD4 ⁺ helper 17
TLR	- Receptores Toll-like
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral- α
Treg	- Linfócito T CD4 ⁺ regulatório
TT	- Hanseníase tuberculoide

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 JUSTIFICATIVA	16
1.2 OBJETIVOS	17
1.2.1 Objetivo geral	17
1.2.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 HISTÓRIA	19
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	20
2.3 CLASSIFICAÇÃO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO POR <i>M.</i> <i>LEPRAE</i>	22
2.4 DIAGNÓSTICO	26
2.4.1 Diagnóstico sorológico	26
2.4.2 Diagnóstico baseado na resposta celular	28
2.4.3 Diagnóstico baseado na resposta imune humoral e celular	29
2.4.4 Diagnóstico molecular	29
2.5 IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS	31
2.5.1 Mapeamento <i>in silico</i>	31
2.5.2 Phage display	33
2.5.3 Spot synthesis	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	36
3.1.1 Amostras de pacientes hansenianos e tuberculosos	36
3.1.2 Amostras de indivíduos saudáveis	36
3.2 <i>SPOT SYNTHESIS</i>	36
3.2.1 Síntese de peptídeos sobre membranas de celulose.....	36
3.2.2 Spot synthesis frente a IgM de pacientes hansenianos e sadios	37
3.2.2.1 Produção de frações ricas em IgM	37
3.2.2.2 Mapeamento de peptídeos imunodominantes frente à IgM de pacientes hansenianos	38
3.2.3 <i>Spot synthesis</i> frente à IgG de pacientes hansenianos e sadios	39
3.2.3.1 Mapeamento de peptídeos imunodominantes frente à IgG de pacientes hansenianos	39

3.3 AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS EPITOPOS DE IGG	40
3.3.1 Síntese dos peptídeos na forma solúvel.....	40
3.3.2 Conjugação dos peptídeos com proteína carreadora.....	40
3.3.3 Imunoensaio de ELISA com os peptídeos carreados.....	40
3.3.4 Imunoensaio de ELISA com os peptídeos carreados em associação	41
3.3.5 ELISA de competição com peptídeos solúveis.....	42
3.3.6 Imunoensaio de Dot Blotting com os peptídeos carreados	42
3.4 MAPEAMENTO <i>IN SILICO</i> DE EPITOPOS DE CÉLULAS T CD4	43
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS PARA ANTICORPOS DO TIPO IGM DE PACIENTES HANSENIANOS	46
4.2 IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS PARA ANTICORPOS DO TIPO IGG DE PACIENTES HANSENIANOS	49
4.3 PEPTÍDEOS 1 E 2 DISTINGUEM SOROS DE INDIVÍDUOS HANSENIANOS DE SOROS SADIOS E TUBERCULOSOS POR ELISA INDIRETO	53
4.4 PEPTÍDEOS 1 E 2 SÃO RECONHECIDOS PREFERENCIALMENTE PELOS SOROS DE PACIENTES MB.....	56
4.5 PEPTÍDEOS 1 E 2 ASSOCIADOS AUMENTAM A PRECISÃO DO TESTE DE ELISA INDIRETO	60
4.6 SOROS HANSENIANOS RECONHECEM DE FORMA ESPECÍFICA OS PEPTÍDEOS 1 E 2	62
4.7 SOROS HANSENIANOS RECONHECEM DE FORMA DIFERENCIADA OS PEPTÍDEOS 1 E 2 EM ENSAIO DE DOT BLOTTING	65
4.8 IDENTIFICAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE EPITOPOS PARA CÉLULAS T	69
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
5.1 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	73
REFERÊNCIAS.....	75

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença granulomatosa infecciosa crônica, causada pela infecção do bacilo *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular obrigatório que habita os vacúolos de queratinócitos, macrófagos e células de Schwann, causando danos a pele, mucosas, ossos e aos nervos periféricos do hospedeiro (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015).

Caracterizada por ser uma doença imunologicamente complexa, a hanseníase produz espectros imunológicos distintos nos pacientes infectados e possui longos períodos de incubação que podem chegar a até 20 anos (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015). Esta complexidade resulta em dificuldades no controle da doença, o que pode ser demonstrado pelos cerca de 200 mil novos casos diagnosticados anualmente ao redor do mundo nas últimas décadas, sendo que entorno de 5% destes novos casos já apresentam deformidades e grau de debilitação avançados (WHO, 2019).

Apesar deste impacto como um problema de saúde global, a hanseníase continua sendo uma doença negligenciada, em que os baixos investimentos em pesquisas geram lacunas nos conhecimentos acerca da patologia (REED; MCKERROW, 2018). Alguns aspectos, como as rotas de transmissão do *M. leprae* entre pessoas ou a partir de reservatórios ambientais, o envolvimento de marcadores genéticos do bacilo e do hospedeiro na resistência ou susceptibilidade a doença (SMITH et al., 2015) e a ausência de protocolos para o cultivo *in vitro* deste patógeno, permanecem sendo desafios para o combate da hanseníase que precisam ser mais bem investigados (REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015).

Somado a estes fatores, o diagnóstico precoce é outra grande lacuna, pois a maior parte dos indivíduos infectados não apresenta sintomas, à medida que os métodos atuais recomendados para a detecção de indivíduos hansenianos são baseados na observação de sinais clínicos da infecção, ou seja, quando é detectado certo grau de comprometimento da sensibilidade ou o surgimento de lesões na pele (STEINMANN et al., 2017).

1.1 JUSTIFICATIVA

A falta de estratégias de vigilância e monitoramento epidemiológico eficazes contribui para a perpetuação da hanseníase. Dessa forma, tecnologias que permitam a detecção dos estágios iniciais e subclínicos da doença, o acompanhamento de contatos de pacientes hansenianos e a identificação de indivíduos mais propensos à infecção são essenciais para o controle da doença (SMITH et al., 2014).

Apesar das inúmeras iniciativas em direção à identificação de novos biomarcadores e ao design de técnicas inovadoras para o diagnóstico da hanseníase, as particularidades da doença apresentam-se como obstáculos ao desenvolvimento de uma plataforma única que seja capaz de detectar com elevadas sensibilidade e especificidade o amplo espectro clínico dos pacientes infectados.

O surgimento e aprimoramento de novas tecnologias, tais quais imunoinformática e as bibliotecas de peptídeos, vêm possibilitando a descoberta, de forma mais rápida e eficiente, de regiões proteicas específicas ao *M. leprae* e com capacidade de serem reconhecidas por anticorpos e receptores de células T de pacientes hansenianos.

Por consequência, a caracterização do potencial diagnóstico dos novos antígenos identificados é fundamental para o estabelecimento de métodos que, em conjunto com os marcadores já avaliados em outros estudos, possam ser empregados para a detecção da infecção por *M. leprae*.

Logo, estimulados pelo sucesso obtido em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo, o presente estudo buscou identificar antígenos de proteínas de *M. leprae*, através de estratégias de mapeamento *in silico* e de bibliotecas de peptídeos, e avaliar a capacidade destes epitopos no diagnóstico de pacientes hansenianos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Identificar e caracterizar sequências peptídicas de *M. leprae* com potencial antigênico para o diagnóstico sorológico da hanseníase.

1.2.2 Objetivos específicos

-Identificar regiões imunodominantes de proteínas de *M. leprae* reconhecidas por anticorpos de pacientes hansenianos.

-Avaliar a capacidade de peptídeos em detectar anticorpos de pacientes hansenianos, de forma a distingui-los de indivíduos saudáveis e tuberculosos através de métodos imunoquímicos.

-Avaliar a especificidade dos peptídeos identificados frente ao soro de pacientes hansenianos.

-Realizar o mapeamento *in silico* de proteínas de *M. leprae* em busca de epítopos de células T.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRIA

A hanseníase é uma das doenças infecciosas que há mais tempo assola a humanidade, sendo mencionada em registros escritos que datam desde o século VI A.C. Porém, a mais antiga evidência, até o momento, do aparecimento da doença foi obtida através de uma biópsia realizada em um esqueleto humano de 2000 A.C., na Índia. (ROBBINS et al., 2009).

Ainda que não haja consenso sobre sua origem, indícios apontam para o surgimento da hanseníase no leste africano ou no sudoeste asiático, seguido de disseminação para as demais regiões do velho mundo, com exceção do oeste africano. Nesta região, assim como no continente americano, o colonialismo e o tráfico de escravos foram os responsáveis por introduzir e espalhar a hanseníase (MONOT et al., 2005). No Brasil, os primeiros casos foram relatados por volta do ano de 1600, na cidade do Rio de Janeiro (LASTÓRIA; ABREU, 2014).

Cercada por grande estigma em diferentes culturas e sociedades, a hanseníase resulta, até o presente, em inúmeros transtornos psicossociais aos infectados. Isto pode ser atribuído aos próprios danos físicos causados pela doença que progressivamente debilitam o indivíduo, as medidas de internação obrigatória, que visavam exclusivamente confinar e isolar os doentes, ou ainda simplesmente a questões religiosas (LASTÓRIA; ABREU, 2014; RAFFERTY, 2005; TSUTSUMI et al., 2007).

Os progressos mais relevantes em direção a melhor compreensão da hanseníase foram obtidos apenas no século XIX, durante um grande surto da doença na Noruega. Isto estimulou a condução de uma série de estudos que culminaram, em 1847, com a publicação do primeiro livro científico ilustrado que diferenciava a hanseníase de outras doenças infecciosas da pele e caracterizava as duas principais variações da doença. Na sequência deste avanço, em 1873, durante análises de amostras da mucosa nasal de um paciente infectado, foi realizado o isolamento e a identificação do *Mycobacterium leprae* como agente causador da hanseníase pelo Dr. Gerhard Armauer Hansen (BENNETT; PARKER; ROBSON, 2008).

Embora tenha sido o primeiro patógeno bacteriano identificado (BENNETT; PARKER; ROBSON, 2008), a impossibilidade de cultivo do *M. leprae in vitro* resultou em atrasos na busca de terapias que pudessem combater a doença (SMITH et al., 2000). Isto foi de certo modo superado, a partir da implementação da dapsona como a primeira droga antibiótica para o tratamento da hanseníase (KAR; GUPTA, 2015) e com o estabelecimento do tatu (*Dasypus novemcinctus*) como modelo *in vivo* para o crescimento em laboratório do *M. leprae* (BALAMAYOORAN et al., 2015).

Contudo, o elevado período necessário para a cura dos pacientes – de aproximadamente 6 a 12 meses (WHITE; FRANCO-PAREDES, 2015) – e o surgimento de variedades de *M. leprae* resistentes a dapsona tornaram necessária a procura por novas estratégias terapêuticas. Dessa forma, duas outras drogas, a ramfipicina e a clofazimina, passaram a ser administradas em associação à dapsona. O estabelecimento da poliquimioterapia como tratamento padrão, a partir da década de 1980, (KAR; GUPTA, 2015), possibilitou uma gradual redução do número total de casos nas décadas seguintes (SMITH et al., 2000).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

O controle da hanseníase em 112 dos 122 países considerados endêmicos até 1985 (RINALDI, 2005) conduziu a uma percepção de que esta doença poderia ser eliminada antes do início do século XXI (PENNA; PENNA, 2007). Dados indicavam que, enquanto entre 1960 e 1980 existiam por volta de 10 a 12 milhões de infectados por *M. leprae* no mundo, esse número havia caído pela metade em 1991 (REIBEL; CAMBAU; AUBRY, 2015). Neste contexto, a OMS aprovou uma resolução que previa a eliminação da hanseníase, tendo como meta a diminuição do número de casos globais para menos de 1 a cada 10.000 habitantes até o ano 2000 (SASAKI et al., 2001).

Embora este índice tenha sido atingido, considerando a média mundial, diversos novos pacientes continuam sendo diagnosticados com hanseníase todos os anos ao redor do mundo (BARRETO et al., 2015). Estima-se que cerca de 200.000 novos casos sejam detectados anualmente, sendo que apenas 3 países - Índia, Brasil e Indonésia - respondem por aproximadamente 80% de todas as notificações (WHO, 2019). O alto número de casos nestes países ilustra uma maior prevalência do *M. leprae* em regiões em desenvolvimento de clima (sub) tropical, localizadas não

somente no leste asiático e nas Américas, mas também na África, no Pacífico Ocidental e na parte Oriental do Mediterrâneo (TIWARI; RICHARDUS, 2016).

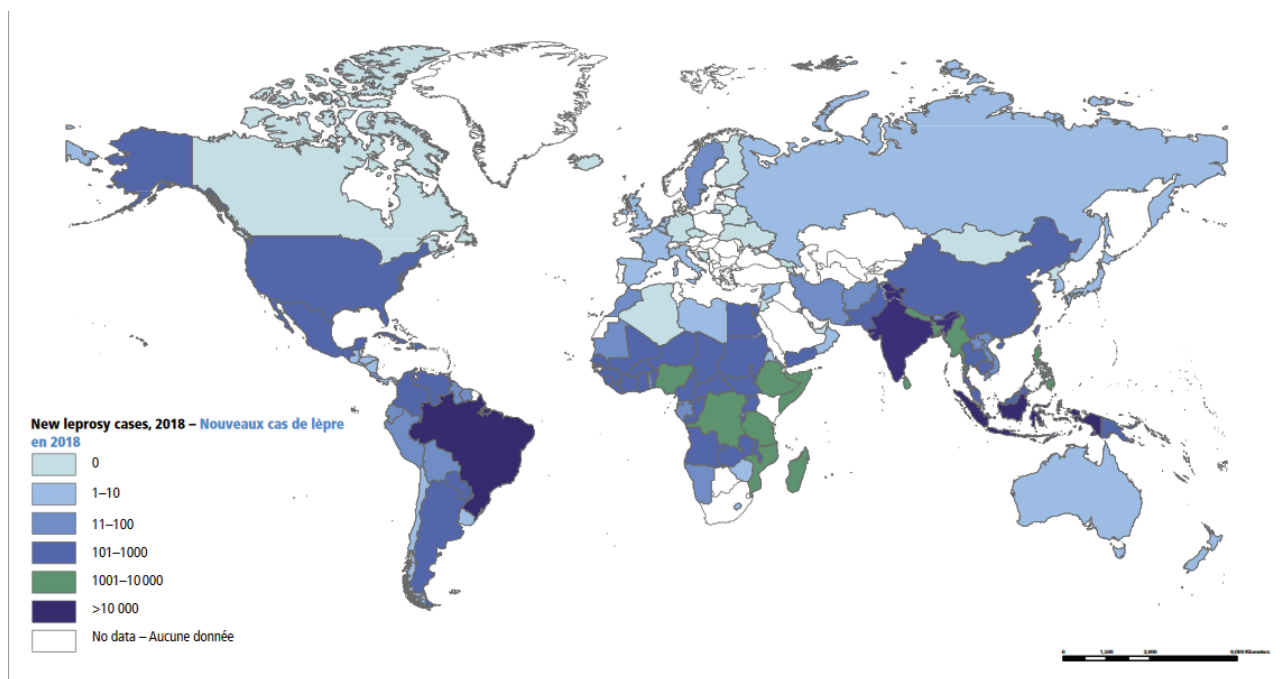


FIGURA 1 – Distribuição global do número de novos casos de hanseníase em 2018. Fonte: WHO (2019).

O Brasil ocupa a segunda posição na lista de países com maior número de novos casos ao ano no mundo (FREITAS; DUARTE; GARCIA, 2016), com um número de 28.660 novos casos em 2018 (WHO, 2019). Isto representa 93% de todos os casos reportados no continente americano nesse ano e a 15% das notificações mundiais (FREITAS; DUARTE; GARCIA, 2016).

De modo similar ao que ocorre globalmente, fatores como baixa escolaridade, higiene precária e privações alimentares contribuem para uma maior incidência de hanseníase no Brasil (KERR-PONTES et al., 2006). Tais condições são recorrentes em áreas socioeconomicamente carentes, como as regiões Centro Oeste, Norte e Nordeste, as quais apresentaram taxas de detecção entorno de 30 casos a cada 100.000 habitantes entre os anos de 2012 e 2016 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2018) e onde o risco de infecção por *M. leprae* é de 5 a 8 vezes maior do que entre indivíduos das regiões Sul e Sudeste (NERY et al., 2014).

Embora a melhora de indicadores socioeconômicos tenha contribuído para a queda do total de infectados em muitas nações desenvolvidas (NERY et al., 2014), a

estagnação das taxas de incidência nos países ainda infectados e a contínua detecção de novos casos em crianças indicam que a transmissão do *M. leprae* continua ativa (SMITH et al., 2014). Somado a isto, aspectos específicos da modulação da resposta imune em indivíduos infectados dificultaram o desenvolvimento de métodos diagnósticos e imunoproláticos eficientes para a contenção da doença (DUTHIE; SAUNDERSON; REED, 2012).

Embora técnicas diagnósticas 100% sensíveis e específicas ainda não existam, a descoberta de que determinados antígenos induziam a formação de células T CD4 multifuncionais, mais eficazes em conferir proteção contra doenças infecciosas (BEZERRA-SANTOS et al., 2018), conduziram ao primeiro estudo clínico em humanos de uma vacina para a hanseníase (DUTHIE et al., 2019).

2.3 CLASSIFICAÇÃO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA À INFECÇÃO POR *M. LEPRAE*

A hanseníase é uma doença imunologicamente complexa, em que o tipo de resposta imune produzida pelo hospedeiro desempenha papel importante não só quanto a questões de resistência e susceptibilidade à infecção, mas também a classificação clínica dos pacientes (FONSECA et al., 2017).

A manifestação clínica da hanseníase é caracterizada pela existência de dois polos imunológicos distintos e opostos, os quais são separados por variações imunologicamente instáveis da doença (GASCHIGNARD et al., 2016). Através de observações histopatológicas, clínicas e da carga bacteriana em pacientes hansenianos, Ridley e Jopling (1966) estabeleceram a classificação tradicional do espectro hanseniano em cinco grupos, sendo as duas formas polares denominadas de hanseníase lepromatosa (LL) e hanseníase tuberculoide (TT), e as formas intermediárias chamadas de borderline lepromatosa (BL), borderline tuberculoide (BT) e borderline borderline (BB).

De modo a facilitar a classificação operacional dos indivíduos infectados, a Organização Mundial da Saúde (OMS) dividiu o espectro hanseniano em apenas dois grupos. Assim, pacientes com um número de lesões na pele menor ou igual a cinco e baixa carga bacteriana (TT e BT) passaram a ser classificados como paucibacilares (PB), enquanto que os que não se enquadravam neste critério (LL, BL e BB) foram denominados de multibacilares (MB) (GASCHIGNARD et al., 2016).

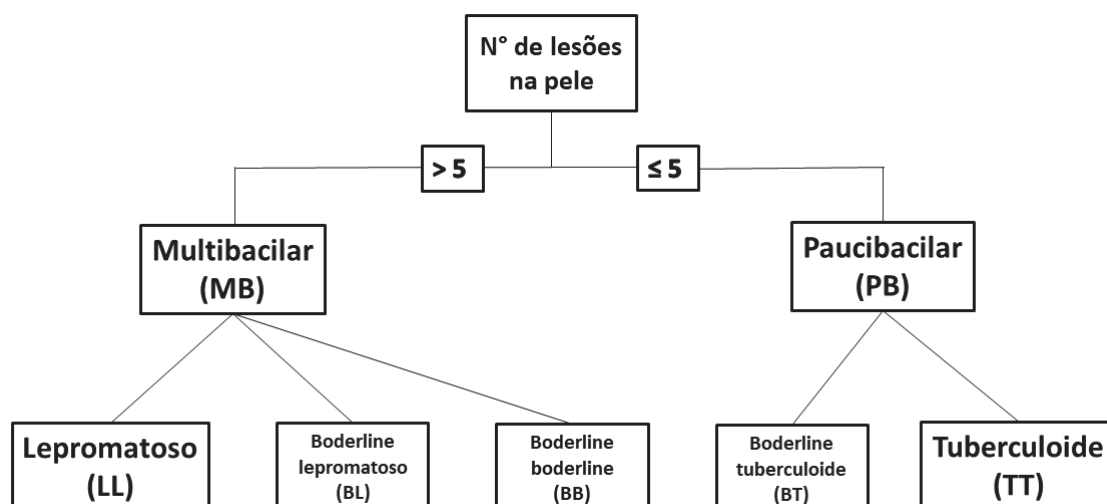


FIGURA 2 – Classificação do espectro hanseniano de acordo com a divisão clássica, estabelecida por Ridley e Jopling (1966), e conforme classificação operacional. Fonte: O autor (2020).

Do ponto de vista imunológico, a hanseníase desencadeia uma resposta imune dicotômica, mediada pelos linfócitos T CD4⁺ helper 1 (Th1) ou T helper 2 (Th2), com padrões distintos de liberação de citocinas. Assim, indivíduos capazes de combater a infecção geram uma resposta predominantemente celular, mediada por células Th1, que estimula a liberação de moléculas pró-inflamatórias, como interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 2 (IL-2), bem como baixa produção de anticorpos anti-*M. leprae*. De forma oposta, a mediação por linfócitos Th2 gera uma resposta proeminentemente humoral, com elevado título de anticorpos contra o bacilo e a secreção de citocinas anti-inflamatórias, como as interleucinas IL-4 e IL-10 e o fator de crescimento transformador- β (TGF- β). Neste perfil imune há propensão para a instalação do patógeno e progressão da doença (SCHUENEMANN et al., 2013), ainda que somente 10% dos indivíduos que entram em contato com o *M. leprae* efetivamente desenvolvam a patologia (ZHANG et al., 2016).

Ao relacionar a resposta imunológica com a classificação clínica, pode-se dizer que o espectro PB está envolvido com uma resposta mediada por células Th1, em que o controle da infecção e a eliminação do patógeno são decorrentes de uma resposta predominantemente celular. Por outro lado, uma resposta mediada por linfócitos Th2 é encontrada em indivíduos MB, cuja prevalência de uma resposta humoral torna o hospedeiro mais predisposto a propagação do bacilo (YAMAMURA

et al., 1991). E são os primeiros eventos de contato do sistema imunológico com o patógeno essenciais para moldar a resposta imune do hospedeiro.

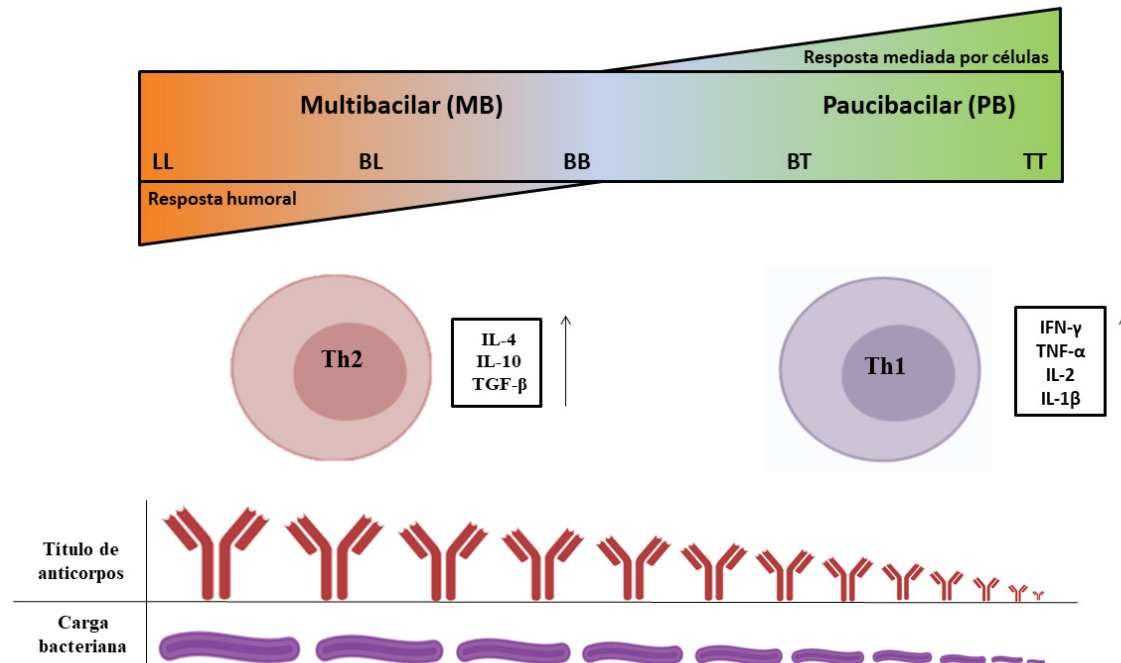


FIGURA 3 – Resposta imunológica dicotômica desenvolvida pelo espectro hanseniano em função da infecção pelo patógeno *M. leprae*. Fonte: O autor (2020).

No início da resposta imunológica inata, receptores toll-like (TLR) e NOD-like (NLR) fazem o reconhecimento de lipoproteínas micobacterianas e ativam uma série de mecanismos pró-inflamatórios que levam a destruição do *M. leprae*. Enquanto os TLR estimulam a síntese de peptídeos antimicrobianos dependentes de vitamina D e a produção de fatores de transcrição que amplificam o sinal inflamatório, como o NF-κB, os NLR ativam o processo de autofagia da célula infectada via gene LRRK2 (PINTO et al., 2018). Por consequência, polimorfismos nestes receptores vêm sendo descritos como responsáveis por favorecer a instalação do *M. leprae* em indivíduos susceptíveis (CARDOSO et al., 2011).

Por sua vez, os macrófagos são outro tipo celular que exerce atividade fundamental para o estabelecimento de uma resposta que leve ao controle ou susceptibilidade a infecção pelo bacilo. Ao serem ativados, macrófagos imaturos podem sofrer diferenciação entre os fenótipos M1 ou M2. A formação de uma população do subtipo M1 está relacionada com o desenvolvimento de uma resposta imunológica mediada por células Th1, em que há liberação das citocinas

inflamatórias IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, as quais estimulam a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a produção de óxido nítrico, aumentando a capacidade do macrófago em destruir o patógeno (YANG et al., 2016).

Já o contrário é observado quando há diferenciação dos macrófagos no subtipo M2. Neste caso, ocorre a secreção de citocinas anti-inflamatórias e de fatores de crescimento, como IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β e o fator de crescimento básico de fibroblasto (FGF-b), os quais regulam negativamente a resposta imune, a expressão de MHC de classe II e favorecem a entrada e manutenção do bacilo no interior do macrófago (DE SOUSA; SOTTO; QUARESMA, 2017; YANG et al., 2016).

De modo similar a influência que a diferenciação dos macrófagos exerce sobre o destino da resposta imunológica, o papel de outras subpopulações de linfócitos T CD4⁺ também vem sendo demonstrado. Estudos mais recentes apontam que a atividade de células Th17 (DE ALMEIDA-NETO et al., 2015; SADHU et al., 2016; SAINI et al., 2016; SANTOS et al., 2017) e de células T regulatórias (Treg) (SADHU et al., 2016; SAINI et al., 2016) pode estar associada à eliminação ou sobrevivência do *M. leprae* no hospedeiro, assim como a proporção entre células Treg e Th17 pode estar vinculada à ocorrência e à magnitude das reações de hipersensibilidade do tipo 1 e 2 em pacientes hansenianos (SAINI et al., 2016).

Exames realizados em indivíduos infectados encontraram maiores níveis de IL-17, uma interleucina secretada por células Th17 e envolvida no recrutamento de neutrófilos e na produção de moléculas microbidas, em células sanguíneas periféricas e em amostras de tecidos de pacientes TT, em comparação com aqueles LL (DE ALMEIDA-NETO et al., 2015; SANTOS et al., 2017). Contudo, danos ao tecido neural foram correlacionados com uma maior liberação de IL-17, já que esta regula negativamente a expressão do receptor do fator de crescimento neural (NGF), interferindo sobre a regeneração e a remodelagem do tecido lesionado mediadas por NGF (AARÃO et al., 2016).

Em contraposição, células Treg exercem efeito limitante sobre a extensão das reações inflamatórias e a atividade dos linfócitos T CD4⁺ efetores. Análises realizadas em amostras de pacientes doentes demonstraram este efeito supressor, uma vez que maiores frequências do subtipo Treg foram verificadas em indivíduos LL do que em TT, além de que a restauração da atividade dos linfócitos Th1 foi

observada em 40% dos pacientes na ausência de células Treg (BOBOSHA et al., 2014).

2.4 DIAGNÓSTICO

O envolvimento de diversos fatores no estabelecimento da resposta imunológica contra o *M. leprae* dificulta a implantação de um método de diagnóstico único para todo o espectro hanseniano, especialmente para pacientes PB. O exame clínico, suportado pela determinação, por microscopia, do número de bacilos em amostras de tecidos lesionados, continua sendo a técnica recomendada para o diagnóstico da hanseníase. Este é, desta forma, clinicamente confirmado através da constatação de pelo menos um de três sinais clínicos: presença de manchas na pele com perda de sensibilidade local; espessamento dos nervos periféricos e comprometimento da função motora; e pelo exame baciloscópico positivo (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2016).

Embora 97% dos pacientes hansenianos possam ser corretamente identificados a partir da constatação desses três sinais em conjunto (EICHELMANN et al., 2013), o exame clínico e a baciloscopia têm emprego limitado, já que necessitam de um cada vez mais escasso corpo técnico experiente e treinado, requerem estrutura física, em geral, indisponível nas áreas de maior incidência da hanseníase, e são insensíveis para indivíduos nos primeiros estágios da infecção - geralmente assintomáticos - ou com baixo número de bacilos (PB) (PARKASH, 2009).

Esses fatores têm contribuído para a busca de novas técnicas e biomarcadores que possam ser utilizados para o diagnóstico precoce da hanseníase em indivíduos assintomáticos, de modo sensível, específico, simples e rápido (GELUK, 2013a). Dentre estes métodos, podem ser citados aqueles que empregam a sorologia, a resposta imune mediada por células ou a biologia molecular para a detecção do *M. leprae*.

2.4.1 Diagnóstico sorológico

A descoberta de que indivíduos hansenianos com elevada carga micobacteriana produziam altos títulos de imunoglobulina M (IgM) contra um

glicolípido presente na membrana do *M. leprae*, o glicolípido fenólico I (PGL-I), conduziu a uma série de estudos para o emprego desta molécula no diagnóstico da hanseníase (SPENCER; BRENNAN, 2011). A identificação de anticorpos contra a forma nativa do PGL-I ou contra seus derivados di ou trissacarídicos semissintéticos, NDO-BSA e NTO-HSA, respectivamente, mostrou-se útil como método de apoio à classificação operacional dos doentes, para o acompanhamento da resposta do paciente a poliquimioterapia e como indicador do risco de ocorrência de reações de hipersensibilidade ao fim do tratamento ou de desenvolvimento da forma MB da doença em contatos de pacientes hansenianos (DE MOURA et al., 2008).

De forma contrária, a detecção de anticorpos anti-PGL-I é limitada em indivíduos PB, cuja baixa produção de anticorpos resulta em reatividades reduzidas e em elevado número de falsos negativos (LOBATO et al., 2011). Resultados ligeiramente superiores foram observados ao combinar a capacidade do antígeno LID-1, um fusionado composto pelas proteínas ML0405 e ML2331 de *M. leprae* (DUTHIE et al., 2007), de ser reconhecido por imunoglobulinas G (IgG) de pacientes hansenianos com a detecção de IgM pelo NDO-BSA (DUTHIE et al., 2014a; FABRI et al., 2015; VAN HOOIJ et al., 2017).

No entanto, um aumento mais relevante na sensibilidade foi adquirido ao acoplar a leitura de um teste imunocromatográfico, empregando a associação NDO-LID como antígeno, a um telefone celular. Ainda que somente 52.6% dos pacientes PB tenham sido identificados, esta plataforma apresentou avanços em relação ao tempo até o diagnóstico, uma vez que entre 10 a 20 amostras podem ser analisadas em um intervalo de apenas 30 minutos (DUTHIE et al., 2014b).

Outros antígenos foram igualmente avaliados em técnicas de diagnóstico sorológico, mas que também encontraram dificuldades na detecção de pacientes PB. Dentre esses, podem ser citados uma proteína quimérica formada pela fusão de múltiplos epitopos de proteínas de *M. leprae*, denominada de PADL (DUTHIE et al., 2010), a lipoarabinomanana (LAM), presente na superfície da célula micobacteriana e que pode ser reconhecida por imunoglobulinas A (IgA) da saliva de pacientes hansenianos (NAHAS et al., 2018) e diversas outras proteínas recombinantes de *M. leprae* (LIMA et al., 2017; SPENCER et al., 2011).

Se por um lado os métodos sorológicos propiciam baixa sensibilidade no diagnóstico de pacientes PB, biomarcadores que avaliem a resposta mediada por

células Th1, característica da resposta imune produzida por esses indivíduos, poderiam ser empregados para a identificação do grupo PB (PARKASH, 2009).

2.4.2 Diagnóstico baseado na resposta celular

O teste de Mitsuda foi o primeiro método que explorava a construção da resposta celular em determinados pacientes hansenianos, induzida pela presença de um extrato de bacilos inativados, chamado de lepromina. A técnica consiste em injetar a lepromina na região intradérmica do indivíduo e avaliar o diâmetro do granuloma formado após 21 a 28 dias, de modo que granulomas maiores que cinco milímetros indicam resultado positivo para hanseníase. Indivíduos PB usualmente apresentam formação de granuloma, enquanto o inverso é verificado em MB (LASTÓRIA; DE ABREU, 2014).

Entretanto, é comum a formação de granuloma em decorrência de reatividade cruzada com outras micobactérias, sobretudo em locais onde há ampla cobertura da vacina para BCG e alta incidência de tuberculose (GELUK, 2013b). Isto restringe a utilização do teste de Mitsuda apenas como método prognóstico, diferenciando pacientes entre PB e MB (NATH; SAINI; VALLURI, 2015).

Ensaios mais específicos passaram a ser estudados, visando a identificação de antígenos capazes de estimular a liberação de biomarcadores da resposta celular, em especial IFN- γ , em culturas de células sanguíneas. Inspirados pelo sucesso dos ensaios de liberação de IFN- γ para diagnóstico da tuberculose (PAI et al., 2014), as proteínas ESAT-6 (GELUK et al., 2002) e CFP-10 (GELUK et al., 2004), homólogas entre *Mycobacterium tuberculosis* e *M. leprae*, foram analisadas para o imunodiagnóstico da hanseníase. Apesar de não serem reconhecidas por voluntários saudáveis, foi observada elevada reatividade cruzada destas proteínas frente a amostras de indivíduos hansenianos, tuberculosos e seus contatos.

Alta produção de IFN- γ também foi observada em células sanguíneas de contatos de pacientes hansenianos ao serem estimuladas por antígenos recombinantes específicos ao *M. leprae*, quando combinados (OLIVEIRA; HUNGRIA; FREITAS, 2014) ou individualmente. Além disso, enquanto padrões similares de liberação de IFN- γ foram obtidos em populações provenientes de áreas endêmicas distintas para a hanseníase, diferenças foram observadas ao analisar indivíduos de uma mesma cidade, mas residentes em regiões com níveis de

prevalência diferentes. Estes resultados indicam que, apesar do pouco valor diagnóstico, os ensaios de quantificação de IFN- γ poderiam ser utilizados como indicadores do grau de exposição de uma determinada população ao *M. leprae* e como ferramenta para monitorar a transmissão e o risco de desenvolvimento da hanseníase (GELUK et al., 2012).

2.4.3 Diagnóstico baseado na resposta imune humoral e celular

Uma vez que a resposta imune contra o *M. leprae* é particularmente dicotômica, o desenvolvimento de plataformas únicas que possam realizar, ao mesmo tempo, o diagnóstico de todo o espectro hanseniano, apresenta-se promissor por combinar o potencial de detecção das abordagens sorológicas e de medição da resposta celular (GELUK, 2013a).

Neste sentido, um dispositivo imunocromatográfico, combinando a detecção simultânea de marcadores pró-inflamatórios, IP-10 e CCL4, de uma citocina anti-inflamatória, a IL-10, e de anticorpos IgM anti-PGL-I foi desenhado para identificar ambos os tipos de respostas imunes. Esta associação possibilitou maior distinção entre indivíduos doentes e saudáveis, incluindo os contatos, bem como melhor classificação dos pacientes entre MB e PB (VAN HOOIJ et al., 2016). Aumentos nos percentuais de sensibilidade e especificidade também foram constatados após aplicação de um dispositivo multiplex similar em outras três populações endêmicas para hanseníase (VAN HOOIJ et al., 2018) e após adaptação deste dispositivo para um formato altamente empregável em campo (CORSTJENS et al., 2019).

Outras pesquisas têm aproveitado a propriedade da LID-1 de também estimular a secreção de marcadores da resposta Th1 para desenvolver técnicas multiplex que auxiliem o exame clínico e diferenciem a hanseníase de outras doenças da pele. Assim, o já constatado reconhecimento da LID-1 por IgGs de pacientes MB foi somado a capacidade desta proteína quimérica de impulsionar uma maior produção de IFN- γ pelas células sanguíneas de indivíduos PB, em comparação com sujeitos sadios, mas acometidos por dermatoses clinicamente semelhantes a hanseníase (FREITAS et al., 2016).

2.4.4 Diagnóstico molecular

Estratégias de identificação da infecção através do material genético do *M. leprae* têm sido consideradas úteis em casos em que há ausência de bacilos e de lesões na pele, e cujos métodos de detecção convencionais são ineficazes em estabelecer um diagnóstico (MARTINEZ et al., 2014).

Os primeiros estudos de aplicação da reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação do *M. leprae* utilizaram amostras de tatu, experimentalmente infectados, para o estabelecimento de protocolos que pudessem ser empregados na prática (HARTSKEERL; DE WIT; KLATSER, 1989; WOODS; COLE, 1989). Na sequência, amostras humanas de indivíduos hansenianos antes e após tratamento foram avaliadas através da amplificação da região codificadora do antígeno rico em prolina de *M. leprae*. Como era esperado, a sensibilidade da técnica de PCR foi reduzida em pacientes com baixa carga bacteriana (PB) e naqueles submetidos à poliquimioterapia (DE WIT et al., 1991).

Grandes avanços foram obtidos com a introdução do PCR em tempo real, isto porque esta nova técnica demonstrou ser mais sensível e específica do que a PCR convencional, assim como possibilitou a quantificação da carga bacteriana, permitindo a diferenciação entre as diferentes formas clínicas da hanseníase e apresentando-se como método alternativo ou de suporte a baciloscopia (BARBIERI et al., 2019; LINI; SHANKERNARAYAN; DHARMALINGAM, 2009; MARTINEZ et al., 2006).

Outra descoberta importante foi a de que a detecção de DNA de *M. leprae* em amostras de sangue de contatos de paciente hansenianos indicava um risco 15 vezes maior de desenvolvimento da hanseníase. Este resultado aponta para outro possível emprego da PCR em tempo real no monitoramento de indivíduos em situação de risco, em conjunto com outros marcadores, como a sorologia positiva para anticorpos anti-PGL-I (REIS et al., 2014).

Contudo, grande parte do material biológico utilizado para as análises é proveniente de biópsias da pele, cuja coleta é altamente agressiva ao paciente. Amostras menos invasivas, tais quais, sangue e urina, foram verificadas como substitutas, porém quedas acentuadas nos percentuais de sensibilidade foram encontradas a partir da utilização destes materiais. A baixa aplicabilidade de amostras menos invasivas (TATIPALLY; SRIKANTAM; KASETTY, 2018) e o custo elevado dos métodos de diagnóstico molecular, especialmente para regiões com

poucos recursos, como os países endêmicos para a hanseníase, limitam a utilização desta técnica (BANERJEE et al., 2011).

2.5 IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS ANTÍGENOS

O desenvolvimento de novas estratégias de mapeamento de epitopos permitiu a identificação em larga escala e a custo reduzido de antígenos mais específicos e eficientes para o design de métodos diagnósticos e de vacinas. Dentre estas novas estratégias, a imunoinformática e construção de bibliotecas de peptídeos (TOMAR; DE, 2010) por *phage display* e *Spot synthesis*, vêm sendo ferramentas amplamente utilizadas para a identificação de antígenos.

2.5.1 Mapeamento *in silico*

As abordagens de mapeamento *in silico*, como a imunoinformática, emergiram após o surgimento das técnicas de sequenciamento de genoma, possibilitando análises comparativas do proteoma entre espécies semelhantes e o mapeamento de proteínas inteiras para a rápida identificação das regiões mais antigênicas e específicas de um organismo alvo. Isto possibilitou a redução do número de possíveis candidatos aos ensaios experimentais, poupando recursos e tempo (PATRONOV; DOYTCHINOVA, 2013).

A depender do tipo de método diagnóstico visado, sorológico ou de quantificação da resposta celular, a predição de possíveis antígenos deve estar baseada na identificação de epitopos que possam ser reconhecidos pelos receptores das células B (BCR) ou T (TCR), respectivamente.

Neste sentido, os algoritmos de predição de epitopos para TCRs baseiam-se na verificação de moléculas que possuam afinidade de ligação pelos antígenos leucocitários humanos (HLA) de classe I e II. Estes são expressos nas superfícies celulares e responsáveis por exporem os peptídeos processados pelas células para reconhecimento pelos TCRs (PATRONOV; DOYTCHINOVA, 2013).

Ao passo que o HLA I prefere ligantes de tamanhos menores, com nove a onze resíduos, e é mais restritivo a variações nas propriedades físico-químicas dos peptídeos, as predições de antígenos para o HLA I encontram-se melhor estabelecidas, com taxas de precisão entorno de 90%. De maneira oposta, os

sistemas *in silico* têm dificuldade em determinar corretamente peptídeos com afinidade pelo HLA II por desconsiderarem o impacto dos resíduos flanqueadores na apresentação do antígeno e a maior tolerância do HLA II quanto ao tamanho dos ligantes (SANCHEZ-TRINCADO; GOMEZ-PEROSANZ; RECHE, 2017; SORIA-GUERRA et al., 2015).

Além disso, a existência de polimorfismos nas moléculas de HLA é outro fator a ser considerado. Grupos étnicos distintos apresentam variações alélicas únicas, as produzem perfis de interação diferentes entre HLA e antígeno. No entanto, padrões de afinidade HLA-peptídeo foram reportados, permitindo o agrupamento dos alelos com perfis semelhantes em supertipos de HLA. Por consequência, é de grande interesse a identificação de peptídeos promíscuos, ou seja, aqueles que se ligam ao maior número possível de supertipos de HLA, possibilitando o reconhecimento pelos TCRs de uma parcela maior da população (SANCHEZ-TRINCADO; GOMEZ-PEROSANZ; RECHE, 2017).

Outro aspecto a ser pontuado é de que quase todos os programas de predição levam apenas em consideração os níveis de afinidade entre peptídeo e HLA, ignorando as etapas de processamento do antígeno pela célula e o próprio reconhecimento do antígeno pelo TCR. Esta etapa, em especial, é fundamental para o sucesso do antígeno como marcador diagnóstico, já que nem toda molécula apresentada pelo HLA é imunogênica, isto é, nem todo ligante com afinidade ao HLA é capaz de ativar uma resposta mediada por linfócitos T (BACKERT; KOHLBACHER, 2015).

O uso da imunoinformática para obtenção de epitopos para testes sorológicos é ligeiramente diferente, uma vez que são desejados antígenos que possam ser fortemente reconhecidos pelos anticorpos produzidos pelo indivíduo contra o patógeno. Assim, possíveis regiões de interação com anticorpos são preditas com base, principalmente, na afinidade de peptídeos e proteínas pelos BCRs (CARMONA et al., 2012).

O primeiro aspecto a ser considerado na identificação *in silico* de epitopos de células B reside na dependência ou não da estrutura 3D da proteína. Epitopos cuja sequência de aminoácidos corresponde a estrutura primária da proteína são denominados de lineares ou contínuos, de modo que quando a constituição aminoacídica do epitopo está diretamente relacionada a conformação da proteína, o

epitopo é dito conformacional ou descontínuo (POTOCNAKOVA; BHADE; PULZOVA, 2016).

Estima-se que cerca de 90% de todos os epitopos de células B sejam conformacionais, porém a maioria dos métodos de predição analisam apenas epitopos lineares. A falta de modelos 3D experimentalmente propostos para muitas proteínas e a dificuldade de isolar o epitopo conformacional da configuração tridimensional da proteína podem explicar a maior existência de programas de predição apenas para epitopos lineares (SANCHEZ-TRINCADO; GOMEZ-PEROSANZ; RECHE, 2017).

De modo similar, grande parte dos algoritmos desenvolvidos desconsideram os rearranjos sofridos pelas regiões antigênicas no momento da interação antígeno-anticorpo. Uma alternativa para a identificação de epitopos conformacionais foi a introdução de programas de predição treinados a partir de dados experimentais obtidos pela seleção de peptídeos miméticos, os chamados mimotopos, através de bibliotecas de peptídeos testadas frente a anticorpos de interesse (POTOCNAKOVA; BHADE; PULZOVA, 2016).

2.5.2 *Phage display*

A tecnologia de *phage display* consiste em modificar geneticamente as proteínas de revestimento, geralmente as proteínas pIII e pVIII, de bacteriófagos filamentosos para que estes expressem em sua superfície sequências peptídicas aleatórias, formando uma biblioteca de peptídeos. Esta biblioteca pode ser, então, submetida a repetidos ciclos de seleção (*biopannings*) frente a uma molécula alvo imobilizada sobre uma superfície (KEHOE; KAY, 2005).

Em cada *biopanning* são realizadas etapas de remoção dos fagos não específicos, seguidas da eluição e amplificação dos peptídeos com maior capacidade de ligação ao alvo. O processo de infecção de cepas *Escherichia coli* é utilizado para replicar os bacteriófagos selecionados. Assim, em cada ciclo de seleção é reduzida a diversidade de fagos, mas ampliado o número de peptídeos específicos ao alvo. Os peptídeos amplificados são submetidos a um novo ciclo de seleção que é repetido de 3 a 4 vezes (KÜGLER et al., 2013).

Ao final, antes de serem sequenciados, os peptídeos selecionados devem ter sua especificidade comprovada por ensaios experimentais frente ao alvo. Isto é

fundamental, pois a amplificação de fagos inespecíficos, selecionados apenas por serem capazes de interagir com materiais e reagentes utilizados na seleção ou por possuírem maior potencial de infecção e propagação na célula bacteriana, é recorrente no *phage display*. Para superar este problema, estratégias de bioinformática (BAKSHSHINEJAD et al., 2016) e de sequenciamento de nova geração (NAQID et al., 2016) vêm sendo propostas.

Ainda assim, o *phage display* mostra-se como ferramenta útil para a identificação de mimotopos – peptídeos que diferem em sequência, mas que apresentam características físico-químicas e espaciais similares aos epitopos originais – para o design de vacinas e métodos diagnósticos (POTOCNAKOVA; Bhide; PULZOVA, 2016; WU et al., 2016), sem necessidade de conhecimento prévio sobre as propriedades estruturais do alvo (BAKSHSHINEJAD et al., 2016).

Para o diagnóstico da hanseníase, três fagos provenientes de quatro bibliotecas foram selecionados após duas estratégias diferentes de *biopanning*, utilizando IgGs extraídas do soro de pacientes MB como alvo (ALBAN et al., 2013). Na sequência, estes três peptídeos foram sintetizados e demonstraram capacidade de reconhecimento de 73.9% e 30% dos pacientes MB e PB, respectivamente (ALBAN et al., 2014). Mais tarde, um dos peptídeos anteriormente identificados revelou-se como um mimotopo de uma sequência peptídica imunodominante presente na proteína Ag85B de *M. leprae*, através da técnica de *Spot synthesis* frente ao soro policlonal de camundongos imunizados (DE SANTANA et al., 2018).

2.5.3 *Spot synthesis*

A técnica de *Spot synthesis* foi inicialmente proposta por Ronald Frank (1992) e consiste na síntese de bibliotecas peptídicas sobre um suporte sólido. Cerca de 8000 peptídeos podem ser imobilizados sobre uma única membrana com dimensões de 20 x 30 cm e serem rapidamente testados para o mapeamento de epitopos lineares e descontínuos ou para o estudo de interações ligante-receptor (KRAMER; SCHNEIDER-MERGENER, 1998).

Peptídeos de tamanhos variados podem ser sintetizados em pontos específicos da membrana, chamados de *spots*. Embora, sequências com até 50 aminoácidos possam ser imobilizadas em cada *spot*, peptídeos menores, com 6 a 15 resíduos são preferíveis (HILPERT; WINKLER; HANCOCK, 2007), uma vez que o

tamanho, bem como as propriedades físico-químicas dos aminoácidos inseridos interferem com a qualidade do processo de síntese e com a pureza dos peptídeos imobilizados. Isto pode levar a resultados falsos que não são posteriormente comprovados em ensaios utilizando a forma solúvel destes peptídeos (KATZ et al., 2011).

As membranas, geralmente, são compostas de celulose, já que este material possui custo reduzido, é resistente aos mais diversos tratamentos químicos utilizados para a síntese dos *spots* e para a reutilização da membrana, além de ser estável em meios aquosos, o que é essencial para a análise de amostras biológicas (HILPERT; WINKLER; HANCOCK, 2007). Porém, a celulose permite a ocorrência de ligações não-específicas, o que dificulta a análise de ensaios realizados com amostras mais complexas, como as culturas celulares (SZYMCZAK; KUO; MRKSICH, 2018).

A formação de ligações inespecíficas na membrana deve ser evitada pela incubação prévia com um agente de bloqueio, de modo que o bloqueio também deve ser incapaz de interagir com o ligante. Assim, a etapa de bloqueio deve ser padronizada, avaliando-se diferentes soluções e diluições da molécula bloqueadora e que se adequem melhor ao ensaio pretendido (KATZ et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

3.1.1 *Amostras de pacientes hansenianos e tuberculosos*

Amostras de soros de 60 indivíduos com diagnóstico clínico confirmado de hanseníase e provenientes do estado de Mato Grosso, Brasil foram utilizadas neste estudo, após aprovação pelo Comitê de Ética Humano em Pesquisa em Seres Humanos sob o número 1080.005.11.02.

Sob este mesmo protocolo, outras dez amostras de soros de indivíduos tuberculosos, coletadas a partir do Hospital Regional da Lapa São Sebastião, no município da Lapa, Paraná, Brasil, foram também empregadas no estudo.

Um maior detalhamento das amostras quanto a gênero, média de idade, municípios de residência e outras características específicas do grupo amostral podem ser obtidas no trabalho de De Santana et al. (2018).

3.1.2 *Amostras de indivíduos saudáveis*

Amostras de 70 doadores de sangue, após análise sorológica do Laboratório de Sorologia do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Paraná (Hemepar), foram utilizadas como controle negativo.

3.2 SPOT SYNTHESIS

3.2.1 *Síntese de peptídeos sobre membranas de celulose*

Proteínas inteiras de *M. leprae* foram sintetizadas sobre duas membranas de celulose através da técnica de *Spot synthesis*, em parceria com o Dr. Ricardo Andrez Machado de Avila (UNESC), e utilizando-se equipamento sintetizador automático de peptídeos MultiPep RS (Intavis Bioanalytical Instruments, Köln, Germany).

Sequências peptídicas de 15 aminoácidos foram sintetizadas, com sobreposição de 12 resíduos, sobre duas membranas de celulose na forma de *spots*, até atingir a região C-terminal de cada proteína. A síntese foi realizada de acordo com o descrito por Laune et al. (2002), empregando aminoácidos Fmoc (9-fluorenilmetoxycarbonila) como grupo protetor.

As proteínas de *M. leprae* sintetizadas foram escolhidas com base nos estudos de antigenicidade realizados por Spencer e colaboradores (2012). As proteínas ML2038, ML0405, ML2055, ML0286, ML0091 e ML0050 foram sintetizadas sobre a Membrana 1 e a proteína ML2028 sobre a Membrana 2, conforme ilustrado pela FIGURA 4.

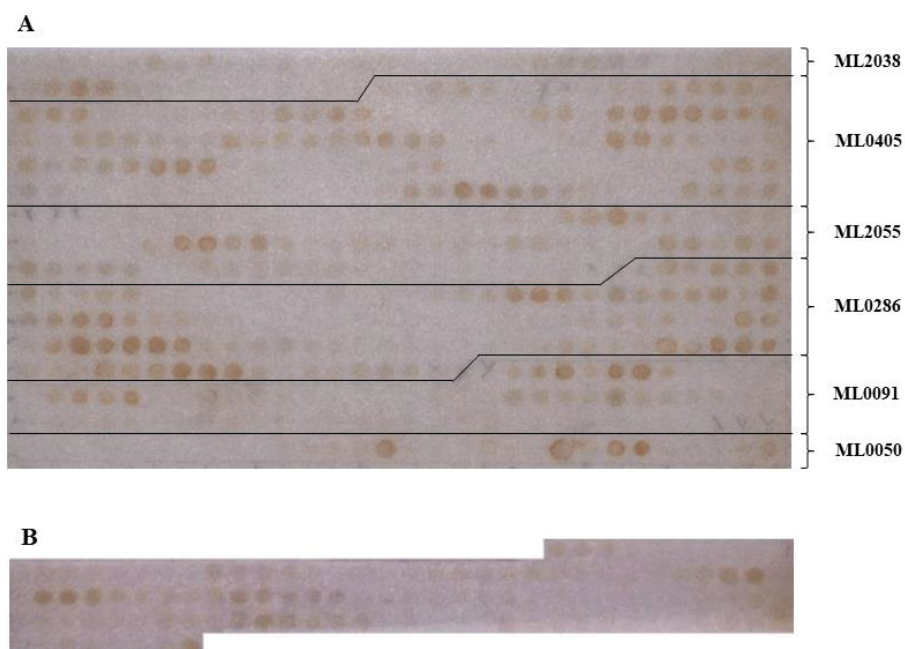


FIGURA 4 – Membranas de celulose após a síntese de sequências peptídicas de proteínas selecionadas de *M. leprae*. Foram sintetizadas sequências peptídicas de 15 resíduos das proteínas de *M. leprae*: A) ML2038, ML0405, ML2055, ML0286, ML0091 e ML0050, sobre a Membrana 1; B) e ML2028, sobre a Membrana 2.

3.2.2 Spot synthesis frente à IgM de pacientes hansenianos e sadios

3.2.2.1 Produção de frações ricas em IgM

A produção de frações ricas em IgM ocorreu conforme o descrito por Roodbari e colaboradores (2003). Brevemente, alíquotas de soros de 50 pacientes

hansenianos ou de 70 voluntários saudáveis foram coletadas em um mesmo recipiente, produzindo *pools* de soros. Em seguida, os *pools* foram diluídos 2,5 vezes em PBS, pH 7,4 e agitados até completa homogeneização. Aos *pools* diluídos foi adicionada uma solução de PEG 6000 (Sigma) 40% em PBS de gota em gota até concentração final de 3%. Os *pools* foram mantidos sob agitação branda em agitador magnético, por 30 minutos e sob refrigeração em gelo. Após centrifugação de 15 minutos, a 3000 ×g e 4 °C, os sobrenadantes foram coletados e uma nova solução de PEG 6000 40% em PBS foi adicionada de gota em gota até concentração final de 8%. Os *pools* foram incubados overnight, sob leve agitação em agitador magnético e a 4 °C. No dia seguinte, os *pools* foram centrifugados por 15 minutos, 3000 ×g e 4 °C, sendo os sobrenadantes descartados e os *pellets* ricos em IgMs de pacientes hansenianos ou sadios ressuspendidos em PBS.

Ao final, a concentração de proteínas das soluções ricas em IgM foi determinada pelo ensaio de Bradford, utilizando BSA como padrão. A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas (Biorad) a 570 nm.

3.2.2.2 Mapeamento de peptídeos imunodominantes frente à IgM de pacientes hansenianos

A reatividade dos peptídeos sintetizados sobre as Membranas 1 e 2 foi verificada por ensaio imunoquímico, conforme descrição a seguir. As membranas foram lavadas três vezes com tampão TBS (KCl 0,002 M, Tris 0,05 M em salina, pH 7,4) e incubadas sob agitação à 37 °C e durante 60 minutos ou à 4 °C e overnight com solução de bloqueio (3% de BSA, TBS-Tween 20 0,1%). Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com solução de lavagem de TBS-Tween 0,1% (TBS-T) e incubadas com diferentes concentrações de soluções ricas em IgM de indivíduos hansenianos ou saudáveis, diluídas em TBS-T contendo 0,5% de BSA.

Após incubação de 60 minutos, sob agitação e à 37 °C, foram realizadas três lavagens com TBS-T e adicionado o anticorpo secundário anti-IgM humana conjugado à enzima peroxidase, em diluição estabelecida em ensaios prévios, por 60 minutos, 37 °C e sob agitação. As membranas foram lavadas com TBS-T e a reatividade antígeno-anticorpo foi detectada com a adição de substrato quimioluminescente (Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrate) e exposição em equipamento fotodocumentador (Amersham, GE Healthcare).

Os resultados obtidos após cada experimento foram avaliados visualmente para identificação dos *spots* mais reativos. Para a reutilização das membranas, estas foram tratadas de forma a eliminar qualquer complexo imunológico. Para isto, as membranas foram lavadas por 30 minutos, a 37 °C com solução A (ureia 8 M, SDS 1%, β -mercaptoetanol 0,1%) e por mais 30 minutos, a 37 °C com solução B (etanol 50%, água destilada 40%, ácido acético 10%). Por último, as membranas foram extensivamente lavadas com TBS antes do reuso.

3.2.3 *Spot synthesis frente à IgG de pacientes hansenianos e sadios*

Os ensaios de mapeamento de epitopos para IgG de pacientes hansenianos foram realizados por De Santana (2017) e serão brevemente descritos aqui, a fim de contextualização dos experimentos realizados em sequência.

3.2.3.1 Mapeamento de peptídeos imunodominantes frente à IgG de pacientes hansenianos

A reatividade dos peptídeos sintetizados sobre as Membranas 1 e 2 (Figura 2) foi verificada por ensaio imunoquímico similar ao descrito para a IgM, com pequenas modificações. Ambas as membranas foram lavadas com TBS e incubadas à temperatura ambiente, sob agitação e por 16 horas com solução de bloqueio. Em seguida, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com 15 mg.mL⁻¹ de IgG, previamente precipitada com sulfato de amônio e dializada, à 37 °C, sob agitação e durante 90 minutos. Após lavagens foi adicionado o anticorpo secundário anti-IgG humana Fc-específica conjugado à enzima peroxidase em diluição de 1:120.000, por 60 minutos, 37 °C e sob agitação.

As membranas foram novamente lavadas e a reatividade antígeno-anticorpo foi detectada com a adição de substrato quimioluminescente (Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrate) e exposição a filme fotográfico. Após avaliação visual dos resultados, os peptídeos das proteínas consideradas mais promissoras foram analisados por densitometria, utilizando o software ImageJ (v. 1.43, National Institutes of Health, EUA), para identificação dos *spots* mais reativos.

3.3 AVALIAÇÃO DIAGNÓSTICA DOS EPITOPOS DE IgG

3.3.1 *Síntese dos peptídeos na forma solúvel*

Duas sequências de peptídeos foram consideradas como mais antigênicas após o mapeamento de epítopos realizado com as Membranas 1 e 2 frente à IgG de pacientes hansenianos. Estes epítopos foram sintetizados quimicamente na sua forma solúvel e com no mínimo 85% de pureza pela empresa Aminotech (Campinas, São Paulo). Aos peptídeos foram adicionados resíduos espaçadores de serina e glicina alternadamente (SGSG) e uma cisteína na porção C-terminal.

3.3.2 *Conjugação dos peptídeos com proteína carreadora*

Para tornar os peptídeos de interesse mais expostos a anticorpos, foi realizada a conjugação dos peptídeos com a proteína carreadora *Keyhole limpet hemocyanin* (KLH). O protocolo de conjugação seguiu o determinado pelo fornecedor (Thermo Scientific Pierce). Resumidamente, soluções de KLH a concentração de 4 mg.mL⁻¹ em PBS foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação com o *crosslinker* sulfo-SMCC (Thermo Scientific - Pierce Chemical Co., Rockford, IL), 20X em excesso molar. Em seguida, moléculas de sulfo-SMCC livres foram removidas através de eluição da solução por uma coluna de dessalinização do tipo PD-10 (Amersham Biosciences), pré-equilibrada com PBS. As frações eluídas foram coletadas e avaliadas quanto à presença de proteínas por leitura das absorbâncias a 280 nm. Apenas as frações mais concentradas foram utilizadas para o acoplamento KLH-peptídeos. Para isto, iguais proporções entre peptídeo e KLH ativado (1:1) foram incubadas por 30 minutos, a temperatura ambiente e sob agitação. O término da reação de acoplamento foi induzido pela adição de solução de L-cisteína a concentração final de 1 mM, sob agitação durante 20 minutos e à temperatura ambiente.

3.3.3 *Imunoensaio de ELISA com os peptídeos carreados*

Microplacas de poliestireno foram sensibilizadas overnight, a 4 °C com 100 µL/poço de solução contendo os peptídeos de interesse acoplados a proteína

carreadora, a uma concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, em tampão carbonato 50 mM, pH 9,6. Em seguida, foram realizadas lavagens com solução de lavagem (0,9% NaCl, 0,05% Tween 20) e as placas foram bloqueadas com solução de bloqueio livre de proteínas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) por 60 minutos, a 37 °C. Após lavagem, foi realizada incubação com soros de pacientes hansenianos, de voluntários saudáveis ou de indivíduos tuberculosos diluídos a 1:100 em tampão de incubação (0,25% caseína, 0,05% Tween 20 em PBS, pH 7,4), por 60 minutos, a 37 °C.

As placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo anti-IgG humana conjugado à biotina, a uma diluição de 1:2.500 em tampão de incubação, durante 60 minutos, a 37 °C. Na sequência, foram realizadas novas lavagens e incubação com solução de estreptavidina-peroxidase, a 1:10.000 em tampão de incubação, por 60 minutos e a 37 °C. As placas foram lavadas e a reatividade dos peptídeos frente aos soros foi verificada pela adição de 100 μL /poço de solução reveladora (0,02% peróxido de hidrogênio, 0,02% o-fenilenodiamina [OPD], tampão citrato, pH 5). Após incubação de 15 minutos ao abrigo da luz, a leitura das absorbâncias foi realizada a 490 nm em leitor de microplacas (Biorad).

3.3.4 Imunoensaio de ELISA com os peptídeos carreados em associação

Microplacas de poliestireno foram sensibilizadas overnight, a 4 °C com 100 μL /poço de solução contendo $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada peptídeo de interesse acoplado a proteína carreadora, diluídos em tampão carbonato 50 mM, pH 9,6. Em seguida, foram realizadas lavagens com solução de lavagem (0,9% NaCl, 0,05% Tween 20) e as placas foram bloqueadas com solução de bloqueio livre de proteínas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) por 60 minutos, a 37 °C. Após lavagem, foi realizada incubação com soros de pacientes hansenianos ou de voluntários saudáveis diluídos a 1:100 em tampão de incubação (0,25% caseína, 0,05% Tween 20 em PBS, pH 7,4), por 60 minutos, a 37 °C.

As placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo anti-IgG humana conjugado à biotina, a uma diluição de 1:2.500 em tampão de incubação, durante 60 minutos, a 37 °C. Na sequência, foram realizadas novas lavagens e incubação com solução de estreptavidina-peroxidase, a 1:10.000 em tampão de incubação, por 60 minutos e a 37 °C. As placas foram lavadas e a reatividade dos

peptídeos frente aos soros foi verificada pela adição de 100 µL/poço de solução reveladora (0,02% peróxido de hidrogênio, 0,02% o-fenilenodiamina [OPD], tampão citrato, pH 5). Após incubação de 15 minutos ao abrigo da luz, a leitura das absorbâncias foi realizada a 490 nm em leitor de microplacas (Biorad).

3.3.5 *ELISA de competição com peptídeos solúveis*

Microplacas de poliestireno foram sensibilizadas overnight, a 4 °C com 100 µL/poço de solução contendo os peptídeos de interesse acoplados a proteína carreadora, a uma concentração de 20 µg.mL⁻¹, em tampão carbonato 50 mM, pH 9,6. Em seguida, foram realizadas lavagens e as placas foram bloqueadas com solução de bloqueio livre de proteínas (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) por 60 minutos, a 37 °C. Em paralelo, *pools* de soros de pacientes hansenianos, diluídos a 1:1.000 em tampão de incubação, foram pré-incubados com concentrações crescentes (2-200 µM) das formas solúveis dos peptídeos de interesse ou de um peptídeo inespecífico por 60 minutos, a 37 °C. Após lavagem das placas, os soros, com ou sem pré-incubação, foram adicionados aos poços e mantidos por 60 minutos, a 37 °C.

As placas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo anti-IgG humana conjugado a biotina, a uma diluição de 1:2.500, em tampão de incubação, por 60 minutos, a 37 °C. Na sequência, foram realizadas novas lavagens e incubação com solução de estreptavidina-peroxidase, a 1:10.000 em tampão de incubação, por 60 minutos e a 37 °C. As placas foram lavadas e a variação das reatividades em função das diferentes concentrações de peptídeos foi verificada utilizando solução reveladora (0,02% peróxido de hidrogênio, 0,02% o-fenilenodiamina [OPD], tampão citrato, pH 5). Após incubação de 15 minutos ao abrigo da luz, a leitura das absorbâncias foi realizada a 490 nm em leitor de microplacas (Biorad).

3.3.6 *Imunoensaio de Dot Blotting com os peptídeos carreados*

Membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF), previamente imersas em solução de metanol, foram utilizadas para a imobilização de 0,5 µg dos peptídeos de interesse, em triplicata, acoplados ao KLH. Como controles, foram utilizados KLH em

sua forma nativa e KLH modificado pelo *crosslinker* sulfo-SMCC, em quantidades iguais as dos peptídeos. Para o imunoensaio, as membranas foram inicialmente bloqueadas overnight, à temperatura ambiente e sob agitação com PBS-Tween-0,3%. *Pools* de soros de pacientes hansenianos, saudáveis ou tuberculosos foram adicionados a uma diluição de 1:1.000 ou a 1:500, dependendo do peptídeo empregado.

Após 60 minutos de incubação, a 37 °C e sob agitação, as membranas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% e mantidas em contato por mais 60 minutos, 37 °C e sob agitação com anticorpo secundário anti-IgG humana, conjugado a enzima peroxidase, a uma diluição de 1:20.000. Em seguida, as membranas foram lavadas e a revelação foi realizada utilizando reagente quimioluminescente de detecção de proteínas (Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrate) em equipamento fotodocumentador (Amersham™ Imager 600, GE Healthcare). As imagens obtidas foram submetidas à análise de densitometria através do software ImageJ (v. 1.43, National Institutes of Health, EUA) para quantificação das reatividades frente aos *pools* de soros. Para reutilização, as membranas foram tratadas durante 30 minutos e a 37 °C com solução de glicina-HCl, pH 2,2 e extensivamente lavadas com PBS antes do reutilização.

3.4 MAPEAMENTO *IN SILICO* DE EPITOPOS DE CÉLULAS T CD4

O mapeamento foi realizado com base em seis proteínas derivadas do genoma de *M. leprae* (ML0286, ML0405, ML2028, ML2038, ML2055 e ML2331), cujas sequências de aminoácidos foram obtidas a partir da base de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org>).

Para a identificação de epitopos de receptores de células T CD4, foi empregado o programa Immune Epitope Database (IEDB; <http://tools.iedb.org/mhcii/>). Os epitopos foram identificados através da predição de possíveis ligantes a 42 alelos de HLA de classe II. A análise foi realizada utilizando o método de predição recomendado pelo IEDB e estabelecendo o tamanho dos peptídeos ligantes em 15 aminoácidos. Destes peptídeos, sequências de nove resíduos, denominadas de *cores*, foram empregadas nas três primeiras etapas de seleção, as quais foram iniciadas pela determinação da afinidade de ligação ao HLA. Somente os *cores* com afinidade de ligação, expressa, neste caso, pela IC50 - a

concentração de peptídeo necessária para inibir em 50% a ligação de um peptídeo radiomarcado ao HLA (WANG et al., 2008) -, menor que 500 nM foram selecionados.

Em seguida, os *cores* mais promíscuos, considerados como aqueles capazes de interagir com pelo menos 25% dos alelos de HLA, foram submetidos a análise de similaridade através da comparação com o proteoma de duas cepas de *M. tuberculosis* (CD1551 e H37Rv) e uma cepa de *Mycobacterium bovis* BCG, utilizando a ferramenta de alinhamento de proteínas, BLASTp, do National Center for Biotechnology Information (NCBI; <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) . Todos os *cores* que produziram alinhamentos com *e-value* maior que 0,1 seguiram para a próxima etapa de seleção. A partir deste ponto, as sequências peptídicas completas de 15 aminoácidos preditas pelo IEDB, de acordo com os respectivos *cores* selecionados, foram utilizadas.

O software VaxiJen (<http://ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) foi empregado para prever a antigenicidade dos peptídeos, estabelecendo um *threshold* de 0,5 e a bactéria como organismo modelo. Peptídeos cujo valor predito foi superior ao *threshold* foram analisados quanto à habilidade de estimular a liberação de IFN- γ pelas células T. Isto foi realizado através do modelo híbrido de predição do programa IFNepitope (<http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/predict.php>). Os peptídeos capazes de estimular a secreção de IFN- γ foram submetidos a uma última etapa de seleção, quanto a critérios físico-químicos de estabilidade (Índice de estabilidade < 40) e hidrofília (*Grand Average of Hydropathy* [GRAVY] < 0), utilizando-se a ferramenta ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>) do Expasy.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os gráficos e análises estatísticas foram produzidos através do software GraphPad Prisma v. 8.0.1 (GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA). Diferenças estatísticas foram obtidas através do Teste t, para comparação entre dois grupos, e da análise de variância (ANOVA) por um fator, com correção do teste de Tukey para múltiplas comparações. As diferenças estatísticas foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05 ($p < 0,05$). Os parâmetros de área sob a curva (AUC), sensibilidade (Se), especificidade (Ep) e *cutoff* foram determinados a

partir das curvas de *receiver operating characteristic* (ROC), através do cálculo do valor máximo do coeficiente de Youden ($J = Se + Ep - 1$) (FLUSS; FARAGGI; REISER, 2005). Os valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN) do teste foram calculados com base em uma taxa de prevalência de 1.48 casos de hanseníase para cada 10.000 habitantes no Brasil, em 2018, conforme dados mais recentes fornecidos pelo Ministério da Saúde brasileiro (disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseníase>).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS PARA ANTICORPOS DO TIPO IgM DE PACIENTES HANSENIANOS

Os primeiros ensaios realizados foram de padronização da diluição do anticorpo secundário anti-IgM humana, acoplado a enzima peroxidase, para minimizar a ocorrência de reações inespecíficas entre o anticorpo secundário e os *spots* das membranas.

Diferentes diluições do anticorpo secundário e tempos de exposição das membranas ao substrato quimioluminescente foram testados, sendo as diluições de 1:600.000, para a Membrana 1, e de 1:700.000, para a Membrana 2, com um tempo de exposição máximo de até 20 minutos, os que apresentaram os melhores resultados (FIGURA 5). Vale ressaltar que o aumento do tempo de exposição para 30 minutos resultou em inúmeras reações inespecíficas entre o anticorpo anti-IgM humana, acoplado a peroxidase, com os peptídeos das membranas (dados não mostrados).

Na sequência, as IgMs obtidas a partir da precipitação dos *pools* de soros hansenianos e saudáveis com PEG 6000 foram incubadas sobre as membranas para a identificação de possíveis peptídeos reconhecidos por esses anticorpos. Inicialmente, as membranas foram incubadas com as IgMs provenientes do *pool* de soros hansenianos e soros de voluntários sadios a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após exposição das membranas por 5 minutos ao substrato quimioluminescente, alguns *spots* mostraram-se reativos, especialmente os peptídeos da Membrana 1 (dados não mostrados).

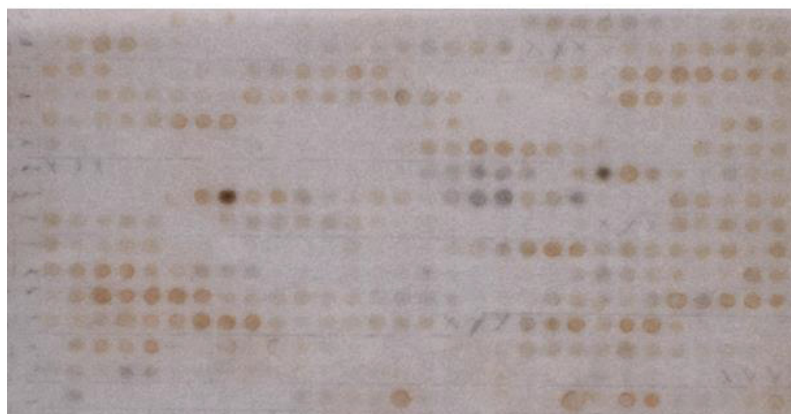
A**B**

FIGURA 5 – Reatividade das Membranas 1 e 2 frente à apenas o anticorpo secundário anti-IgM humana, acoplado a peroxidase. As membranas forma submetidas a 20 minutos de exposição ao substrato quimioluminescente. A) Membrana 1 frente ao anticorpo anti-IgM humana, acoplado a peroxidase, a diluição de 1:600.000. B) Membrana 2 frente ao anticorpo anti-IgM humana, acoplado a peroxidase, a diluição de 1:700.000.

Uma vez que a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ os peptídeos das Membranas 1 e 2 demonstraram maior reatividade frente aos anticorpos de indivíduos saudáveis do que aos anticorpos de pacientes hansenianos, um novo ensaio foi realizado com as IgMs em concentração duas vezes menor. Para isso, um teste inicial foi realizado com as IgMs precipitadas dos soros de voluntários sadios a $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e analisadas novamente por 5 minutos (FIGURA 6). Como é possível observar, as reações inespecíficas foram drasticamente reduzidas, o que motivou um novo ensaio com as IgMs obtidas do *pool* de soros hansenianos a $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e com 5 minutos de exposição (FIGURA 7).

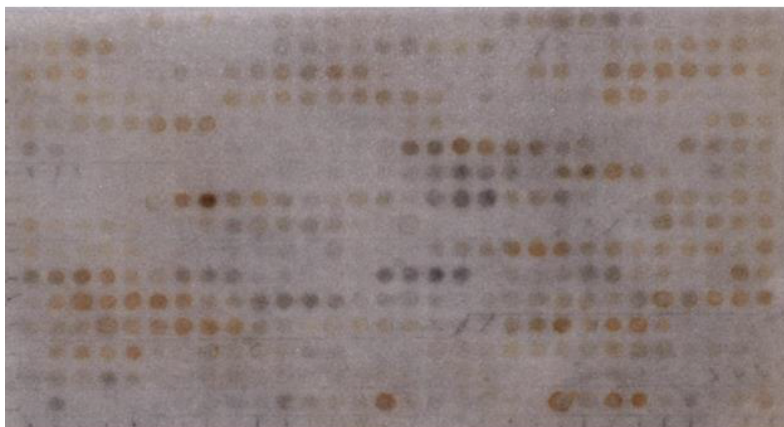
A**B**

FIGURA 6 – Reatividade das Membranas 1 e 2 frente à $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de IgM precipitada a partir de pool de soros saudáveis. As membranas foram submetidas a 5 minutos de exposição ao substrato quimioluminescente. A) Membrana 1. B) Membrana 2.

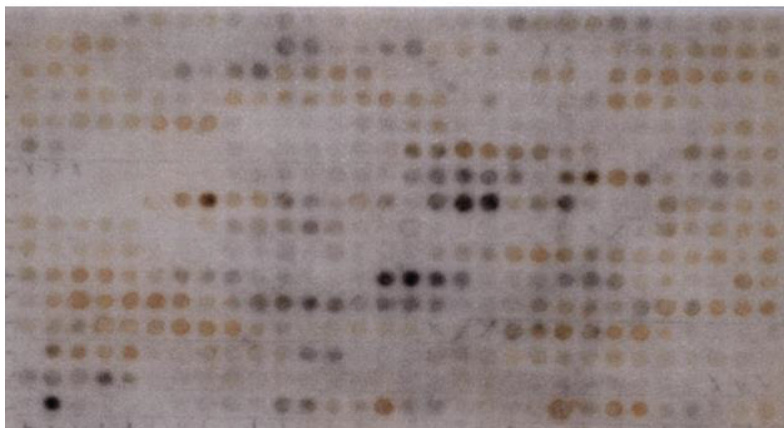
A**B**

Figura 7 – Reatividade das Membranas 1 e 2 frente à $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de IgM precipitada a partir de pool de soros hansenianos. As membranas foram submetidas a 5 minutos de exposição ao substrato quimioluminescente. A) Membrana 1. B) Membrana 2.

Embora a uma concentração de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ alguns *spots* tenham mostrado certa reatividade frente às IgMs dos soros hansenianos, não foi possível identificar

claramente peptídeos altamente reativos ao soro hanseniano e que não apresentaram qualquer interação com os anticorpos de indivíduos sadios, bem como garantir que as reatividades observadas ainda não sofriam algum grau de influência de reações inespecíficas do anticorpo secundário com os *spots*.

A identificação de biomarcadores altamente específicos a infecções por *M. leprae* é fundamental para minimizar a ocorrência de falsos positivos, especialmente em áreas endêmicas, como o Brasil, em que a incidência de hanseníase é concomitante a elevado números de casos de tuberculose e de aplicação da vacina BCG (GELUK et al., 2005). Assim, mais estudos seriam necessários para que os peptídeos que demonstraram certa reatividade nas Membranas 1 e 2 pudessem ser considerados como específicos ou descartados como alvos em potencial para o diagnóstico da hanseníase.

Outro aspecto a ser considerado é a propriedade bioquímica dos antígenos reconhecidos por IgMs de pacientes hansenianos. É amplamente descrito que estes indivíduos produzem elevados títulos de anticorpos do tipo IgM contra a porção sacarídica da molécula de PGL-I (CHO et al., 1983). Logo, é possível que a maior especificidade destas IgMs seja direcionada a moléculas de carboidratos, o que teria sido uma limitação para a identificação de epitopos nas proteínas ML2038, ML0405, ML2055, ML0286, ML0091, ML0050 e ML2028, tendo em vista a metodologia utilizada. Além da IgM, sabe-se que pacientes hansenianos produzem anticorpos do tipo IgG com afinidade por outros polissacarídeos, como a lipoarabinomanana (LAM) (SOUSA et al., 1998).

4.2 IDENTIFICAÇÃO DE EPITOPOS PARA ANTICORPOS DO TIPO IgG DE PACIENTES HANSENIANOS

Os experimentos e as imagens das membranas de celulose apresentadas nesta seção foram produzidos por De Santana (2017) e serão apresentados brevemente apenas para contextualização dos ensaios seguintes. De todas as proteínas sintetizadas sobre a Membrana 1, neste tópico será exposta somente a região correspondente a proteína ML2055. A Membrana 2 será exibida integralmente.

A fim de evitar a ocorrência de reações cruzadas entre o anticorpo secundário e os peptídeos, foram realizadas análises preliminares da diluição do anticorpo anti-

IgG humana, acoplado a peroxidase, que melhor se adequava ao ensaio. Determinou-se que a diluição de 1:120.000, com um tempo de exposição ao filme fotográfico de até 30 minutos, não produzia ligações inespecíficas do anticorpo secundário com os *spots* das membranas, conforme é ilustrado pela FIGURA 8.

Após a padronização da diluição do anticorpo secundário, foram realizados experimentos com as IgGs precipitadas dos soros de pacientes hansenianos. A adição de 10 mg.mL⁻¹ de IgGs, em conjunto com 30 minutos de exposição ao filme fotográfico, produziu os *spots* mais reativos (FIGURA 9). Após avaliação visual preliminar, as proteínas ML2055 e ML2028 foram as que apresentaram as sequências peptídicas mais reativas e por isso os *spots* destas proteínas foram submetidos à análise de densitometria, empregando o software ImageJ. Este programa permite que as imagens sejam analisadas, de modo que as intensidades dos *spots* são apresentadas na forma de valores arbitrários equivalentes a soma dos pixels de uma determinada área.

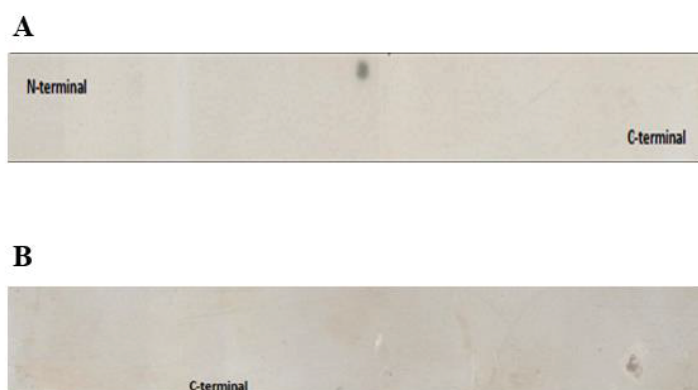


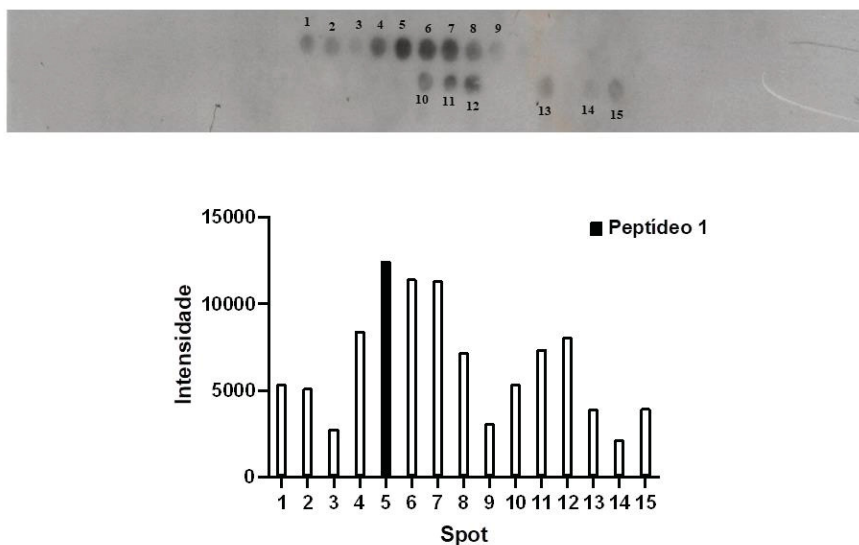
FIGURA 8 – Reatividade dos peptídeos das proteínas ML2055 e ML2028 frente ao anticorpo anti-IgG humana-HRP a diluição de 1:120.000. As membranas foram expostas por 30 minutos ao filme fotográfico. A) ML2055. B) ML2028. Fonte: DE SANTANA (2017).

Em cada proteína, uma região correspondente a 3 sequências peptídicas apresentou-se altamente reativa aos anticorpos de indivíduos hansenianos. Destas regiões imunodominantes, dois peptídeos, aqui chamados de Peptídeo 1 e Peptídeo 2, presentes nas proteínas ML2055 e ML2028, respectivamente, exibiram reatividade superior aos demais.

Para investigar se a reatividade dos *spots* era específica ao soro dos pacientes hansenianos, outro ensaio foi realizado, utilizando as IgGs obtidas a partir do soro de pacientes saudáveis, em concentração igual a do teste anterior. A

reatividade dos peptídeos das proteínas ML2055 e ML2028 frente a anticorpos provenientes de indivíduos saudáveis é praticamente nula (dados não mostrados). Isto pode indicar que as interações observadas entre os peptídeos e as IgGs de pacientes hansenianos representam a produção de anticorpos específicos contra determinadas regiões proteicas do *M. leprae*, em decorrência da infecção, e por isso estas mesmas interações não são verificadas nas amostras de voluntários saudáveis.

A



B

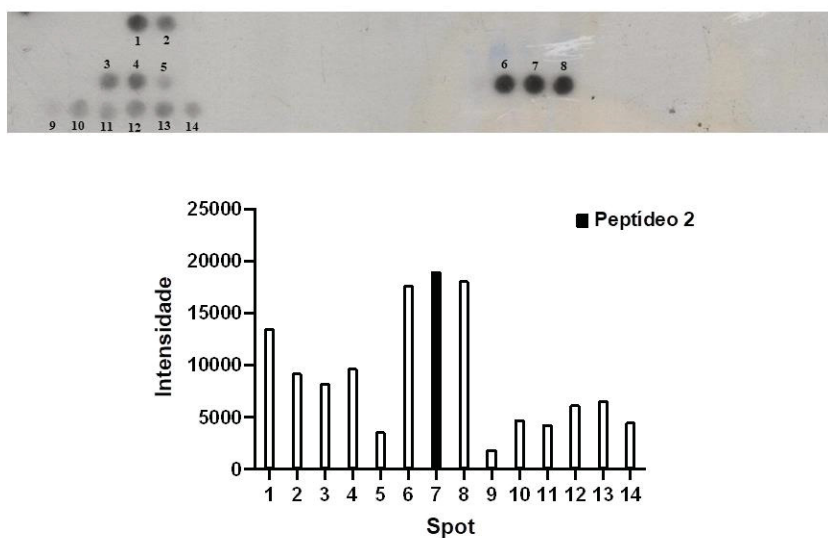


FIGURA 9 – Reatividade dos spots das proteínas ML2055 e ML2028 após ensaio frente aos anticorpos do tipo IgG de pacientes hansenianos (DE SANTANA, 2017), seguido de análise de densitometria. A) Spots reativos da proteína ML2055 e as respectivas intensidades estimadas pela densitometria. Em preto, o spot referente ao Peptídeo 1. B) Spots reativos da proteína ML2028 e as respectivas intensidades estimadas pela densitometria. Em preto, o spot referente ao Peptídeo 2.

A proteína ML2028, também conhecida como Antígeno 85B (Ag85B), é a maior constituinte do complexo imunodominante proteico Ag85, altamente conservado entre as espécies micobacterianas e formado por outros dois componentes, os Ag85A e C. Este complexo é secretado pelo *M. leprae* e está relacionado com a capacidade de adesão do bacilo as células hospedeiras (THOLE et al., 1992). De modo similar, a proteína ML2055, caracterizada por possuir sequências ricas em alanina e prolina, é outra proteína secretada pelo *M. leprae*, cuja função proposta é a de promover a interação do bacilo com receptores de fibronectina presentes em células não fagocíticas, como as células epiteliais e de Schwann, facilitando a invasão do patógeno (SCHOREY et al., 1995).

O fato de serem antígenos secretados pelo *M. leprae* ao longo de seu ciclo de vida reforça a hipótese de que as proteínas ML2055 e ML2028 são interessantes candidatas a alvos antigênicos para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico sorológico, uma vez que secretadas seriam mais facilmente reconhecidas pelas células B durante a infecção (CARMONA et al., 2012).

Diversos estudos foram conduzidos a fim de investigar o potencial de formas recombinantes das proteínas ML2055 e ML2028 na detecção de indivíduos hansenianos, apresentando resultados em consonância com os obtidos neste trabalho. Em um primeiro estudo, Spencer et al. (2011) demonstraram que a proteína recombinante ML2028 era capaz de ser reconhecida por 90% e 65% dos indivíduos MB e PB, respectivamente, por ensaio de ELISA, além de apresentar baixa reatividade frente a soros de voluntários saudáveis.

Este resultado foi reafirmado por Spencer et al. (2012) que também apontaram a proteína ML2028 como um possível biomarcador de desenvolvimento da hanseníase. Além disso, esta e outras duas pesquisas (DUTHIE et al., 2007, 2008a) igualmente indicaram a aplicabilidade da proteína ML2055 para o reconhecimento de soros de indivíduos hansenianos, especialmente MB, ainda que as respostas para as amostras de PB tenham sido limitadas.

Os resultados obtidos por De Santana (2017), em conjunto com os dados descritos na literatura referentes à reatividade das proteínas recombinantes ML2055 e ML2028 frente aos soros de indivíduos hansenianos, incentivou a síntese química dos peptídeos considerados mais reativos pela densitometria e a continuidade dos experimentos para caracterizar o potencial diagnóstico destes peptídeos para a hanseníase.

Por motivo de proteção da propriedade intelectual sobre os epitopos descobertos, as sequências de aminoácidos descritas nesta dissertação não serão apresentadas, sendo denominadas apenas de Peptídeo 1 e Peptídeo 2 para os epitopos identificados nas proteínas ML2055 e ML2028, respectivamente.

4.3 PEPTÍDEOS 1 E 2 DISTINGUEM SOROS DE INDIVÍDUOS HANSENIANOS DE SOROS SADIOS E TUBERCULOSOS POR ELISA INDIRETO

Os Peptídeos 1 e 2 foram sintetizados na forma solúvel, com duas modificações em relação a sua sequência original. Foi inserida uma sequência espaçadora composta por resíduos alternados de serina e glicina (SGSG) e uma cisteína na porção C-terminal de ambos os peptídeos.

A inserção de espaçadores de $(SG)_n$ é uma estratégia amplamente empregada para aprimorar a construção de híbridos proteicos (GURUNG et al., 2014; RAHMAN et al., 2015). Isto é devido a uma maior flexibilidade à ligação entre as estruturas proteicas unidas, com manutenção da funcionalidade dos respectivos domínios, conferida pelas unidades de glicina, bem como pela maior estabilidade do híbrido proteico em soluções aquosas, como no caso de amostras biológicas, em função da formação de ligações de hidrogênio entre os resíduos de serina e a água (CHEN; ZARO; SHEN, 2013).

Além disso, a adição de um resíduo de cisteína foi necessária para possibilitar a utilização de um protocolo de conjugação mais eficiente entre os peptídeos e o KLH, através do *crosslinker* heterobifuncional sulfo-SMCC. Esta molécula reage especificamente com as aminas livres na proteína carreadora e com o grupamento sulfidril da cisteína na porção C-terminal do peptídeo, promovendo a conjugação (PALACIOS et al., 2018). Outra utilidade da cisteína é a sua propriedade de interagir com superfícies metálicas, abrindo perspectivas de aplicação dos peptídeos em biossensores (SHEN et al., 2008).

Dessa forma, os peptídeos sintetizados na forma solúvel com as duas modificações químicas foram conjugados ao KLH e, então, submetidos a ensaios de ELISA para verificar a capacidade destes epitopos em serem reconhecidos pelos anticorpos presentes no soro de pacientes hansenianos e distingui-los de indivíduos saudáveis (CN) e tuberculosos (TB). Para isto, placas de ELISA foram sensibilizadas

overnight com $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dos Peptídeos 1 ou 2, conjugados ao KLH, e testadas frente aos soros de indivíduos hansenianos, CN e TB a diluição de 1:100.

Os resultados do ensaio de ELISA indireto encontram-se nas FIGURAS 10 e 11 para os Peptídeos 1 e 2, respectivamente, e estão expressos em função da média das absorbâncias (a 490 nm) obtidas para cada soro avaliado individualmente, em triplicata. Com base nos dados gerados pelo ELISA, parâmetros do potencial diagnóstico dos Peptídeos 1 e 2, tais como *AUC*, *cutoff*, *Se* e *Ep*, foram quantificados pela construção de curvas ROC, utilizando os soros CN como controles, e calculados a partir do valor máximo do coeficiente de Youden.

Outras medidas da capacidade diagnóstica dos peptídeos, o VPP e o VPN foram definidos segundo uma taxa de prevalência da hanseníase de 1.48 para cada 10.000 habitantes no Brasil, em 2018 (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Todos estes indicadores estão expressos na TABELA 1.

Observa-se pelas Figuras 8 e 9 que os Peptídeos 1 e 2, acoplados ao KLH, são reconhecidos de forma estatisticamente diferente ($p < 0,05$) pelos soros de indivíduos hansenianos, em comparação com os soros CN e TB. Porém, o perfil de reconhecimento dos dois peptídeos é distinto, existindo soros mais reativos a um ou outro peptídeo.

O ensaio de ELISA empregando o Peptídeo 1 possui sensibilidade de 66,67% e especificidade de 97,22%, de modo que 21 dos 36 soros hansenianos são corretamente identificados, enquanto que apenas 1 dos 36 soros CN e nenhum dos soros TB reagem inespecificamente com o Peptídeo 1. Testes com elevada especificidade são úteis para a redução do impacto sobre indivíduos diagnosticados incorretamente com doenças, como a hanseníase, cujo diagnóstico resulta em estigma social e a sujeição do paciente a longos períodos de tratamento (BAHMANYAR et al., 2016).

Já o ensaio utilizando o Peptídeo 2 apresentou maior sensibilidade, igual a 71,88%, detectando 24 dos 32 soros de pacientes hansenianos. Por outro lado, o Peptídeo 2 é reconhecido por um maior número de soros CN (7/32), o que reflete em uma menor especificidade, de 78,13%, além de também apresentar reatividade cruzada com alguns soros TB (4/10).

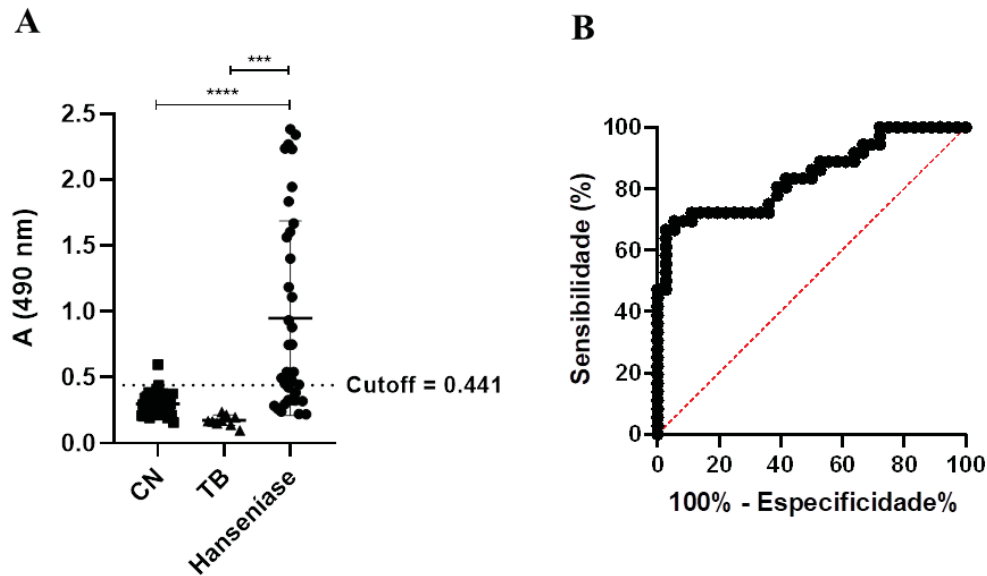


FIGURA 10 – Ensaio de ELISA indireto para o Peptídeo 1 conjugado ao KLH. A) Absorbância a 490 nm do Peptídeo 1 conjugado ao KLH a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, frente aos soros de indivíduos saudáveis (CN, $n = 36$), tuberculosos (TB, $n = 10$) e hansenianos ($n = 36$) a diluição de 1:100. B) Os resultados foram utilizados para gerar uma curva ROC (AUC = 0,8422) característica para o diagnóstico de pacientes hansenianos, empregando o Peptídeo 1 como biomarcador e os soros sadios como controles. *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

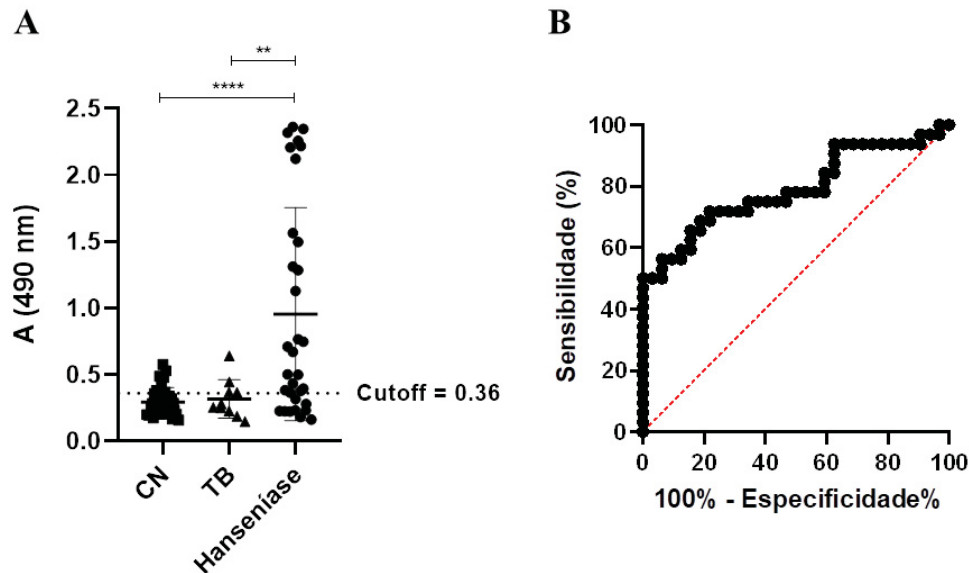


FIGURA 11 – Ensaio de ELISA indireto para o Peptídeo 2 conjugado ao KLH. A) Absorbância a 490 nm do Peptídeo 2 conjugado ao KLH a $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, frente aos soros de indivíduos saudáveis (CN, $n = 32$), tuberculosos (TB, $n = 10$) e hansenianos ($n = 32$) a diluição de 1:100. B) Os resultados foram utilizados para gerar uma curva ROC (AUC = 0,79) característica para o diagnóstico de pacientes hansenianos, empregando o Peptídeo 2 como biomarcador e os soros de voluntários sadios como controles. ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

TABELA 1 – Parâmetros do potencial dos Peptídeos 1 e 2 para o diagnóstico da hanseníase por método de ELISA indireto.

Parâmetro	Peptídeo 1	Peptídeo 2
AUC	0,8422	0,79
Se (%)	66,67	71,88
Ep (%)	97,22	78,13
VPP (%)	0,35	0,05
VPN (%)	99,99	99,99

AUC = área sob a curva; Se = sensibilidade; Ep = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo.

Contudo, um teste de sensibilidade de no mínimo 70%, como o alcançado com o Peptídeo 2, foi considerado como uma ferramenta viável em campanhas de diagnóstico precoce em larga escala para a redução do número de novos casos em populações endêmicas, associando o diagnóstico a inserção imediata do indivíduo a um programa de tratamento adequado (BAHMANYAR et al., 2016).

Além das medidas de sensibilidade e especificidade, os valores de AUC, um parâmetro da probabilidade do teste em atribuir valores superiores a indivíduos doentes do que a sadios, escolhidos aleatoriamente, podem indicar a capacidade diagnóstica do teste. Assim, valores de AUC acima de 0,7, como os atingidos pelo Peptídeo 1 (AUC = 0,8422) e pelo Peptídeo 2 (AUC = 0,79), são considerados como satisfatórios a um método de diagnóstico (MANDREKAR, 2010).

4.4 PEPTÍDEOS 1 E 2 SÃO RECONHECIDOS PREFERENCIALMENTE PELOS SOROS DE PACIENTES MB

Ao analisar as reatividades dos soros hansenianos descritas no tópico anterior de acordo com a classificação operacional, dividindo-os em MB e PB, é possível verificar a capacidade dos Peptídeos 1 e 2 de serem reconhecidos conforme o perfil imunológico dos pacientes. Curvas ROC foram geradas para os dois peptídeos frente aos soros MB e PB, utilizando os voluntários sadios como controles, e os parâmetros do potencial diagnóstico dos Peptídeos 1 e 2 foram novamente estimados. Todos esses dados estão expressos na FIGURA 12, para o Peptídeo 1, na FIGURA 13, para o Peptídeo 2, e na TABELA 2.

Nota-se que o Peptídeo 1 é reconhecido por 80,95% (17/21) dos indivíduos MB, os quais são diferenciados de forma estatisticamente diferente dos soros CN e TB ($p < 0,0001$). Um desempenho reduzido foi obtido ao analisar os indivíduos PB, dos quais somente 46,67% (7/15) reconhecem o Peptídeo 1, ainda que este também seja capaz de diferenciar de forma estatisticamente diferente ($p < 0,05$) o grupo PB do CN e do TB. Em adição, o Peptídeo 1 ainda distingue ($p < 0,05$) indivíduos PB de MB, indicando um possível emprego do Peptídeo 1 para a diferenciação dos pacientes hansenianos de acordo com a resposta imunológica humoral.

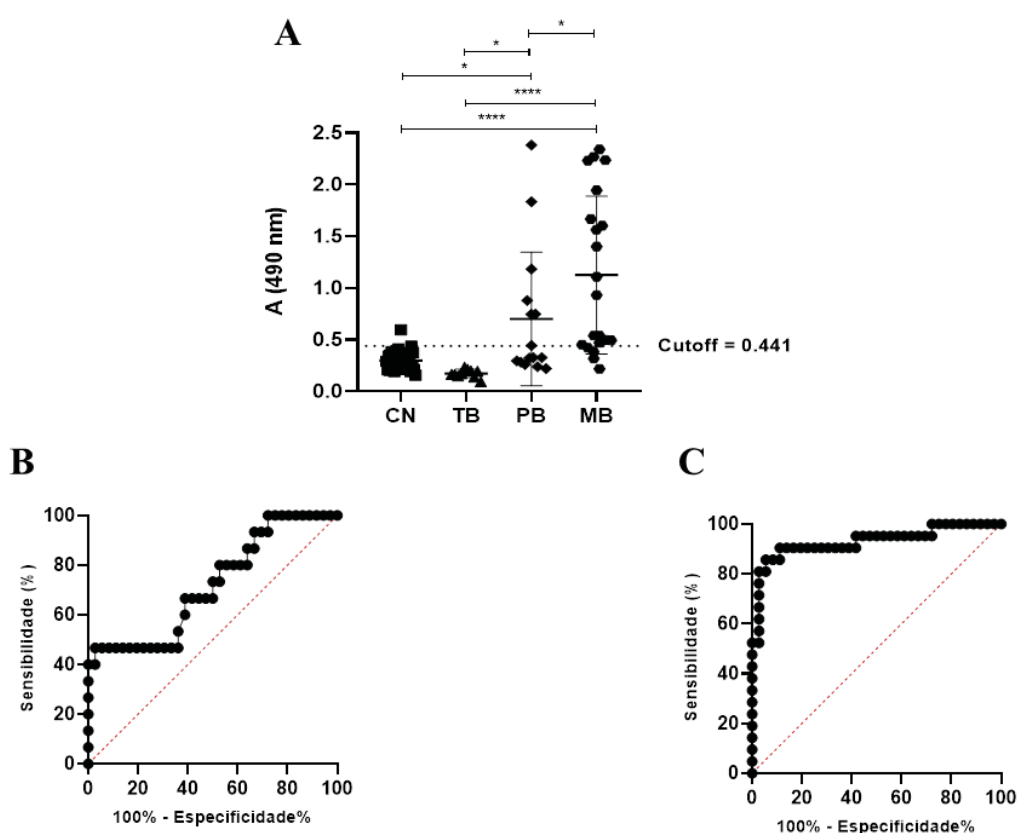


FIGURA 12 – Ensaio de ELISA e curvas ROC geradas para o Peptídeo 1 ao dividir o grupo de pacientes hansenianos entre PB e MB. A) Reatividade do Peptídeo 1 frente aos soros de indivíduos sadios (CN, $n = 36$), tuberculosos (TB, $n = 10$), PB ($n = 15$) e MB ($n = 21$) diluídos a 1:100. B) Curva ROC (AUC = 0,7194) produzida para o Peptídeo 1 ao detectar apenas indivíduos PB, utilizando os soros de voluntários sadios como controles. C) Curva ROC (AUC = 0,9299) produzida para o Peptídeo 1 ao detectar apenas indivíduos MB, utilizando os soros de voluntários sadios como controles. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

Por sua vez, o Peptídeo 2 apresenta performance similar, de modo que 80% (16/20) dos soros MB reconhecem este peptídeo, o qual ainda é capaz de estatisticamente discriminar ($p < 0,05$) indivíduos MB de CN e TB. Para os pacientes

PB, o Peptídeo 2 demonstra um desempenho superior, já que 58,33% (7/12) dos soros PB mostram-se reativos a este peptídeo.

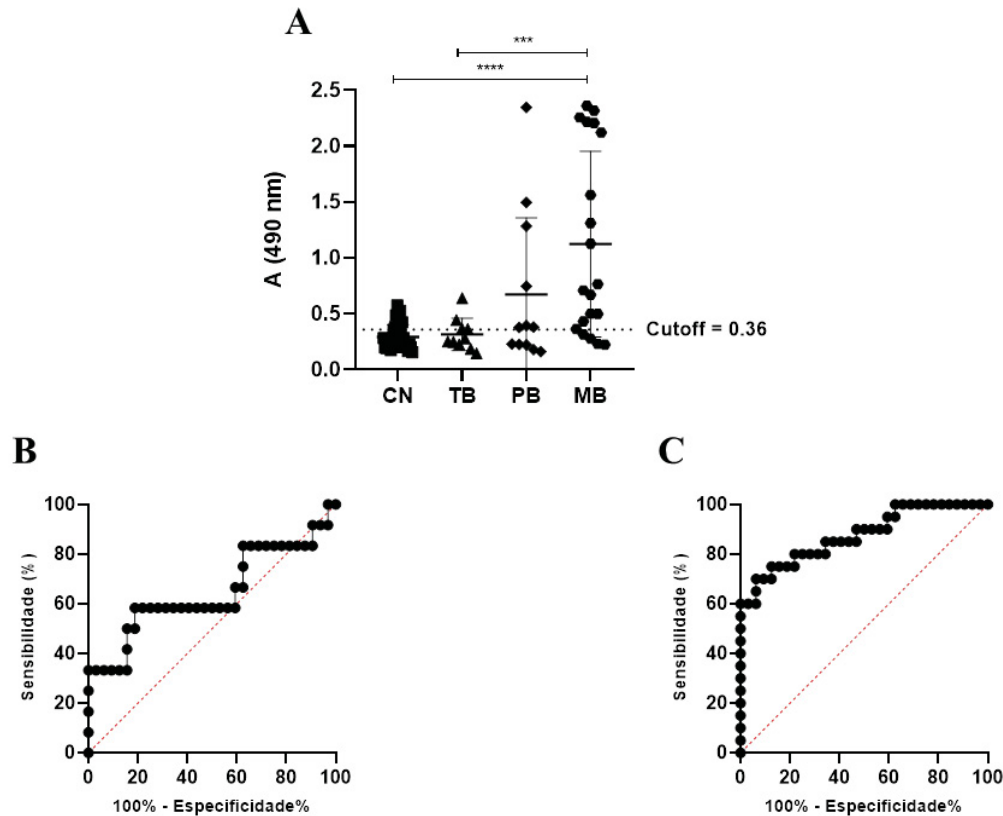


FIGURA 13 – Ensaio de ELISA e curvas ROC geradas para o Peptídeo 2 ao dividir o grupo de pacientes hansenianos entre PB e MB. A) Reatividade do Peptídeo 2 frente aos soros de indivíduos saudáveis (CN, n = 32), tuberculosos (TB, n = 10), PB (n = 12) e MB (n = 20) diluídos a 1:100. B) Curva ROC (AUC = 0,6484) produzida para o Peptídeo 2 ao detectar apenas indivíduos PB, utilizando os soros de voluntários saudáveis como controles. C) Curva ROC (0,875) produzida para o Peptídeo 2 ao detectar apenas indivíduos MB, utilizando os soros de voluntários saudáveis como controles. *** p < 0,001; **** p < 0,0001.

Verifica-se pelas FIGURAS 12 e 13 que o perfil de reconhecimento dos Peptídeos 1 e 2 pelos soros de pacientes PB e MB segue o padrão descrito na literatura, em que a resposta mediada por linfócitos Th1, característica de indivíduos PB, resulta em menor título de anticorpos e consequentemente em reatividades diminuídas em testes de diagnóstico sorológico. De modo oposto, a resposta predominantemente Th2 de pacientes MB acarreta em elevado título de anticorpos produzidos contra antígenos do *M. leprae*, o que promove alto reconhecimento de indivíduos MB por técnicas sorológicas (DUTHIE et al., 2007, 2014b; LOBATO et al., 2011; VAN HOOIJ et al., 2017).

TABELA 2 – Parâmetros do potencial dos Peptídeos 1 e 2 para o diagnóstico de indivíduos PB e MB por método de ELISA indireto.

Parâmetro	Peptídeo 1		Peptídeo 2	
	PB	MB	PB	MB
N° positivos (total)	7 (15)	17 (21)	7 (12)	16 (20)
AUC	0,7194	0,9299	0,6484	0,875
VPP (%)	0,25	0,43	0,04	0,05
VPN (%)	99,99	100	99,99	100

AUC = área sob a curva; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo.

Dessa forma, os Peptídeos 1 e 2 mostram-se eficientes na detecção de indivíduos MB, porém possuem aplicação limitada para a identificação de soros PB. Esta performance equipara-se ao desempenho de outros biomarcadores largamente utilizados em ensaios de ELISA para o diagnóstico da hanseníase: os antígenos PGL-I, LID-1 e a combinação NDO-LID. Duthie et al. (2014a) reportaram taxas de detecção de 90,6% para os MB e de apenas 27% para os pacientes PB provenientes de duas regiões endêmicas distintas, mesmo empregando um protocolo de ELISA otimizado. Percentuais ainda menores foram obtidos por Silva et al. (2017), em que somente 6,4-20% dos PB e 71,43-83,67% dos MB foram corretamente identificados, e por Muñoz et al. (2018), em que sensibilidades de 6,9-20,3% e de 78-89,6% para os indivíduos PB e MB, respectivamente, foram obtidas.

Além desses antígenos, o percentual de soros MB e PB corretamente identificados pode ser também comparado ao obtido por outras proteínas recombinantes de *M. leprae* em ensaios sorológicos. Observa-se pela TABELA 3 que as proteínas recombinantes avaliadas por Duthie et al. (2007) apresentaram baixo reconhecimento dos soros PB, entre 3-27%, e uma elevada variação no reconhecimento de soros MB, entre 29-76%. A exceção foi a proteína ML0405, a qual foi reconhecida por 87% e 69% dos soros MB e PB, respectivamente, apresentando perfil de reconhecimento similar ao apresentado pelos Peptídeos 1 e 2.

TABELA 3 – Comparação do perfil de reconhecimento dos Peptídeos 1 e 2 por soros de pacientes MB e PB em relação a outros antígenos de *M. leprae* descritos pela literatura.

Antígeno	% Positivos		Referência
	MB	PB	
Peptídeo 1	80,95	46,67	Este trabalho
Peptídeo 2	80	58,33	
NDO-LID	90,6	27	DUTHIE et al. (2014a)
PGL-I	71,43	6,4	SILVA et al. (2017)
NDO-LID	83,67	20	
PGL-I	78	6,9	MUÑOZ et al. (2018)
NDO-LID	89,6	20,3	
ML0405	87	69	DUTHIE et al. (2007)
ML2331	76	3	
ML0091	71	6	
ML1633	32	17	
ML2055	75	13	
ML2346	29	27	

4.5 PEPTÍDEOS 1 E 2 ASSOCIADOS AUMENTAM A PRECISÃO DO TESTE DE ELISA INDIRETO

Um ensaio preliminar para verificar se um teste combinando os Peptídeos 1 e 2 seria capaz de aprimorar a capacidade diagnóstica dos peptídeos foi realizado. Poços de ELISA foram sensibilizados com $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada um dos Peptídeos 1 e 2, conjugados ao KLH, e avaliados frente a soros hansenianos e CN individualmente, em triplicata, e a diluição de 1:100.

A FIGURA 14 ilustra as absorbâncias obtidas para cada soro hanseniano em comparação com os soros CN. A combinação dos Peptídeos 1 e 2 em um mesmo teste diagnóstico é capaz de discriminar de modo estatisticamente diferente ($p < 0,01$) os soros de indivíduos hansenianos, em relação ao soros CN. Com uma sensibilidade de 68,75% e especificidade de 100%, 11 dos 16 soros hansenianos analisados foram detectados corretamente. A análise de alguns parâmetros da capacidade diagnóstica do teste (TABELA 4), calculados após a construção da curva ROC, reforça a maior capacidade de identificação de indivíduos hansenianos pelos dois peptídeos combinados.

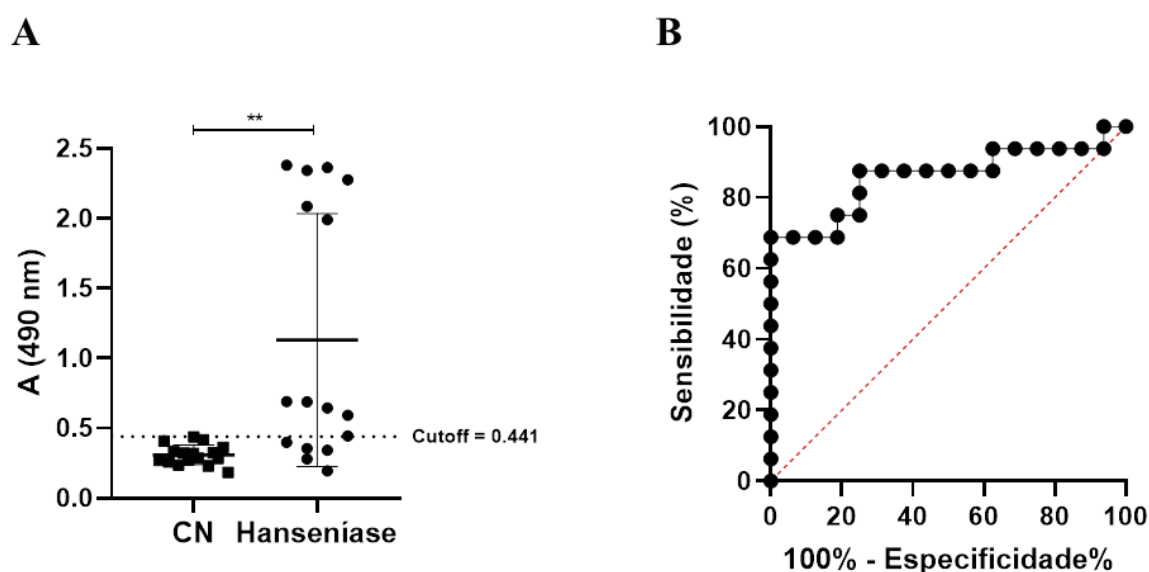


FIGURA 14 – Ensaio de ELISA indireto associando os Peptídeos 1 e 2 conjugados ao KLH. A) Absorbância a 490 nm da combinação de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ dos Peptídeos 1 e 2, conjugados ao KLH, frente aos soros de indivíduos saudáveis (CN, $n = 16$), e hansenianos ($n = 16$) a diluição de 1:100 por ensaio de ELISA. B) Os resultados do ELISA foram utilizados para gerar uma curva ROC (AUC = 0,8594) característica para o diagnóstico de pacientes hansenianos, empregando os Peptídeos 1 e 2 como biomarcadores e os soros de voluntários sadios como controles. ** $p < 0,01$.

TABELA 4 – Parâmetros do potencial da associação dos Peptídeos 1 e 2 para o diagnóstico da hanseníase por método de ELISA indireto.

Parâmetro	Peptídeos 1 e 2
AUC	0.8594
Se (%)	68.75
Ep (%)	100.0
VPP (%)	100.0
VPN (%)	100.0

AUC = área sob a curva; Se = sensibilidade; Ep = especificidade; VPP = valor preditivo positivo; VPN = valor preditivo negativo.

Apesar de a sensibilidade da técnica ter permanecido praticamente igual e de o número de amostras analisadas ter sido menor ao dos peptídeos avaliados separadamente, houve uma melhora significativa dos índices utilizados para avaliar a capacidade diagnóstica de um teste. O valor de AUC igual a 0,8594 e os parâmetros probabilísticos da precisão do método (VPP e VPN) com índices de 100% sinalizam a alta confiabilidade dos resultados obtidos com os peptídeos associados.

Dessa forma, o desenho de um peptídeo quimérico, composto pela fusão das sequências dos Peptídeos 1 e 2, pode ser uma alternativa futura para o emprego destes antígenos. Além da já citada LID-1, uma fusão entre as proteínas ML0405 e ML2331 (DUTHIE et al., 2007), outros antígenos formados pela fusão de proteínas de *M. leprae* foram igualmente propostos e caracterizados. Duthie et al. (2010) fundiram as regiões mais antigênicas de cinco proteínas de *M. leprae* (ML0405, ML2331, ML2055, ML0401 e ML0091) para produzir o PADL, uma quimera composta pelas regiões mais antigênicas destas proteínas. Ainda que seja uma proteína recombinante, foi demonstrado que o PADL manteve a antigenicidade dos epitopos das proteínas na forma nativa, ao verificar as reatividades dos soros de camundongos imunizados com o PADL e com as cinco proteínas individualmente.

Ao invés de peptídeos, Hungria et al. (2012) fusionaram proteínas inteiras de *M. leprae* para produzir as quimeras 46f – combinação entre as proteínas ML0568 e ML0405 – e 92f – fusão entre as proteínas ML2028, ML2346 e ML1862. Enquanto o antígeno quimérico 46f identificou corretamente 86,6% e 33,3% dos soros de indivíduos MB e PB, respectivamente, de três regiões endêmicas do Brasil, a proteína 92f teve desempenho modesto, detectando 64,4% dos pacientes MB e 22,2% dos PB.

4.6 SOROS HANSENIANOS RECONHECEM DE FORMA ESPECÍFICA OS PEPTÍDEOS 1 E 2

Em razão da alta antigenicidade da molécula de KLH, um ELISA de competição foi realizado para confirmar a especificidade da reatividade dos soros dos pacientes frente aos Peptídeos 1 e 2.

Para este experimento, os Peptídeo 1 ou 2, acoplados ao KLH, foram imobilizados em poços de ELISA a $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A inibição da ligação dos anticorpos presentes nos soros aos peptídeos imobilizados foi verificada pela pré-incubação dos *pools* de soros hanseniano com concentrações crescentes (2-200 μM) das formas solúveis do Peptídeo 1 e do Peptídeo 2. Os resultados foram comparados à reatividade dos soros sem pré-incubação (100% de reatividade). O *pool* hanseniano ainda foi pré-incubado com iguais quantidades de um peptídeo inespecífico para comprovar a especificidade da interação entre os anticorpos e os Peptídeos 1 e 2.

A variação das reatividades dos *pool*s de soros hansenianos em função da ligação aos peptídeos solúveis está ilustrada na FIGURA 15, enquanto a porcentagem de inibição da interação entre os soros e os peptídeos carregados encontra-se na FIGURA 16.

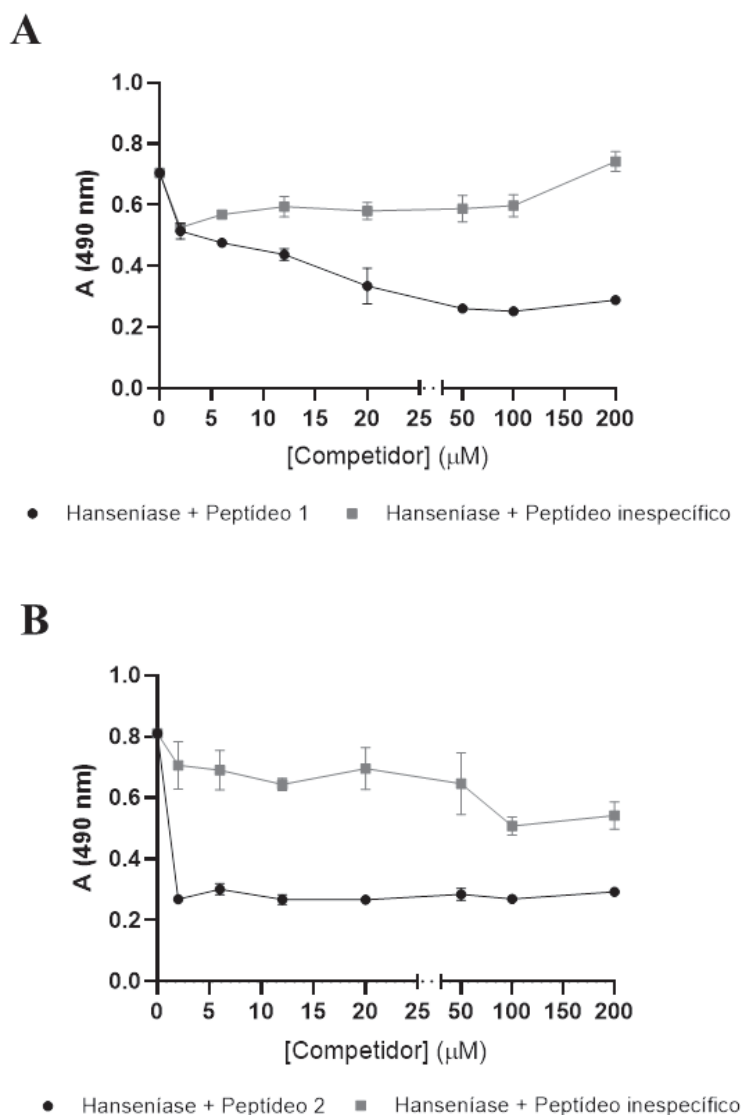
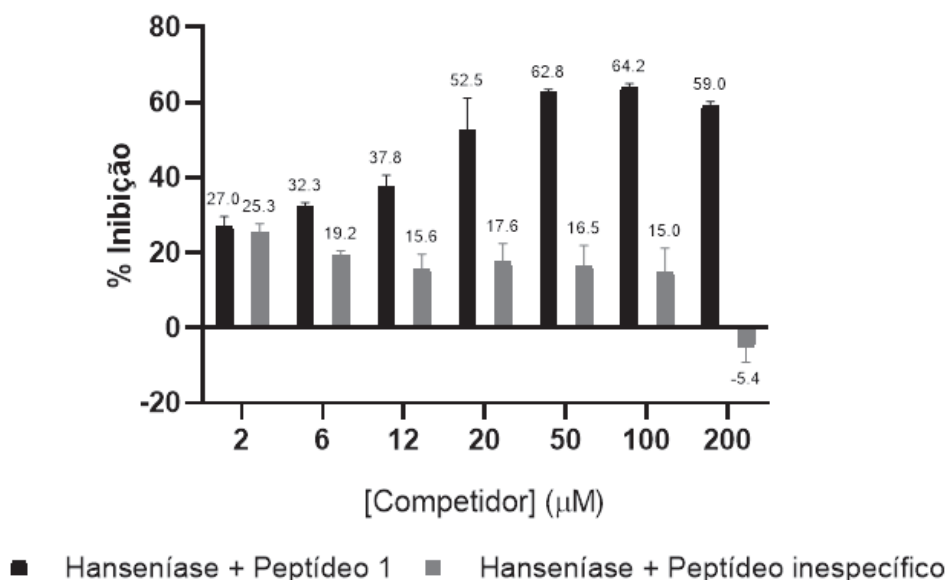


FIGURA 15 – Variação da reatividade do *pool* de soros hansenianos em ensaio de ELISA de competição. A variação das absorbâncias (490 nm) do *pool* de soros hanseniano, a diluição de 1:1000, foi observada em razão do aumento da concentração das formas solúveis de um peptídeo inespecífico e do: A) Peptídeo 1; B) Peptídeo 2.

Ao analisar os resultados alcançados com o Peptídeo 1, observa-se que o aumento da concentração da forma solúvel do Peptídeo 1 provoca redução gradual da reatividade do *pool* de soros hansenianos, atingindo ápice na concentração de 100 μM para a qual a porcentagem de inibição foi de 64.2%. Em adição, a pré-

incubação com o peptídeo inespecífico não foi capaz de inibir de modo relevante o reconhecimento do Peptídeo 1, acoplado ao KLH, pelos anticorpos presentes no *pool* hanseniano.

A



B

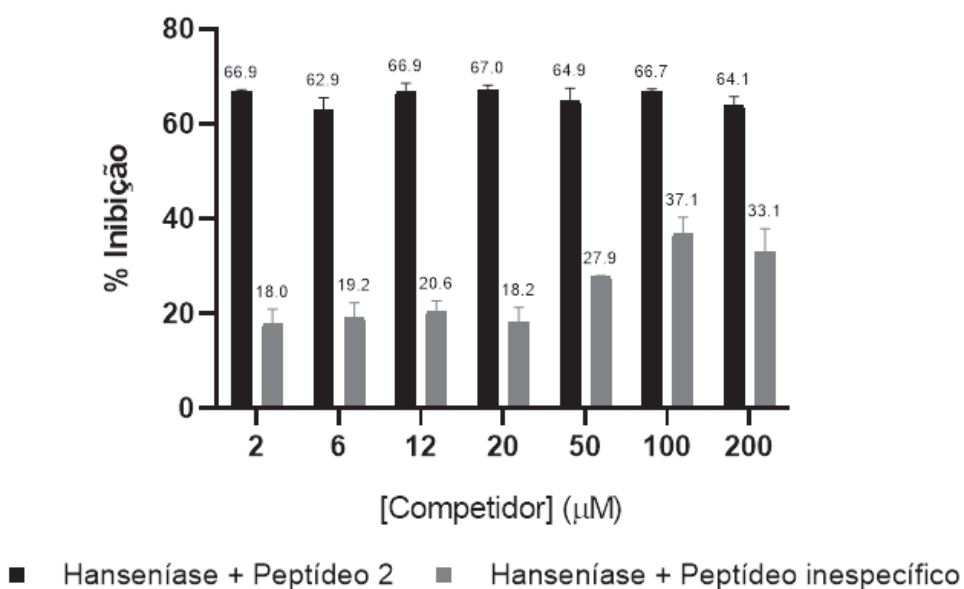


FIGURA 16 – Porcentagem de inibição da interação dos Peptídeos 1 e 2, acoplados ao KLH, com o *pool* de soros hansenianos, a diluição de 1:1000, pré-incubados com concentrações crescentes das formas solúveis de um peptídeo inespecífico e do: A) Peptídeo 1; B) Peptídeo 2. A inibição foi calculada em função da reatividade do pool de soros hansenianos sem pré-incubação (100% reatividade).

O comportamento do Peptídeo 2 no ELISA de competição seguiu o que foi observado no ELISA indireto. O Peptídeo 2 foi reconhecido fortemente pelos anticorpos presentes nos soros hansenianos, o que pode ser comprovado pela queda na reatividade do *pool* hanseniano pré-incubado, mesmo com baixas concentrações da molécula em sua forma livre. Outro ponto a ser levantado, é que o peptídeo inespecífico conseguiu inibir em até 37.1% a interação dos anticorpos hansenianos ao Peptídeo 2 acoplado ao KLH, embora as porcentagens de inibição do Peptídeo 2 livre tenham sido bem superiores e permanecido estáveis acima de 60%.

4.7 SOROS HANSENIANOS RECONHECEM DE FORMA DIFERENCIADA OS PEPTÍDEOS 1 E 2 EM ENSAIO DE DOT BLOTTING

Para corroborar com os resultados obtidos nos ensaios de ELISA, os Peptídeos 1 e 2 foram avaliados pela técnica de Dot blotting. Membranas de PVDF foram utilizadas para imobilizar 0,5 µg dos Peptídeos 1 e 2, acoplados ao KLH, em triplicata. Quantidades iguais da molécula de KLH nativa e do KLH modificado pelo *crosslinker* sulfo-SMCC foram também adsorvidas sobre as membranas. Após a imobilização das estruturas proteicas, o reagente de Ponceau foi aplicado rapidamente para demonstrar a presença das proteínas sobre as membranas de PVDF (FIGURA 17).

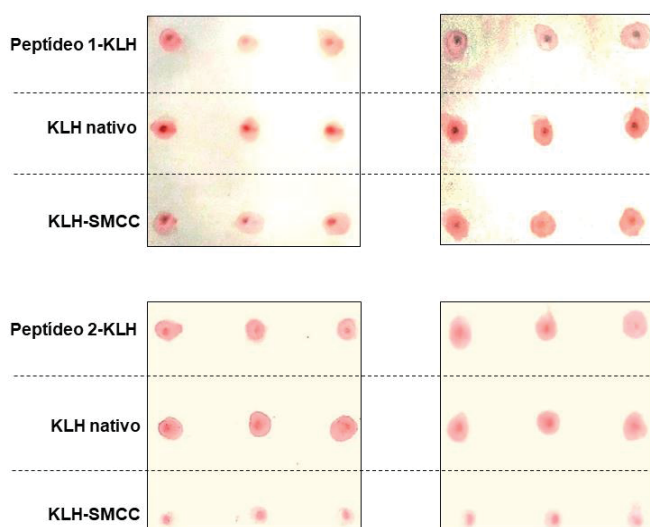


FIGURA 17 – Coloração por reagente de Ponceau das estruturas proteicas imobilizadas sobre as membranas de PVDF.

As reatividades dos peptídeos foram verificadas frente a *pools* de soros hansenianos, CN e TB a diluição de 1:500, para os experimentos realizados com o Peptídeo 1, e de 1:1000, para os ensaios com o Peptídeo 2. As membranas foram expostas por 5 minutos em equipamento fotodocumentador para captação da reação quimioluminescente catalisada pela enzima peroxidase acoplada ao anticorpo anti-IgG humana, a diluição de 1:20.000. As imagens obtidas foram submetidas a análises de densitometria através do software ImageJ para quantificação das reatividades frente aos diferentes *pools* de soros. Os resultados obtidos estão expressos nas FIGURAS 18 e 19 para o Peptídeo 1 e para o Peptídeo 2, respectivamente.

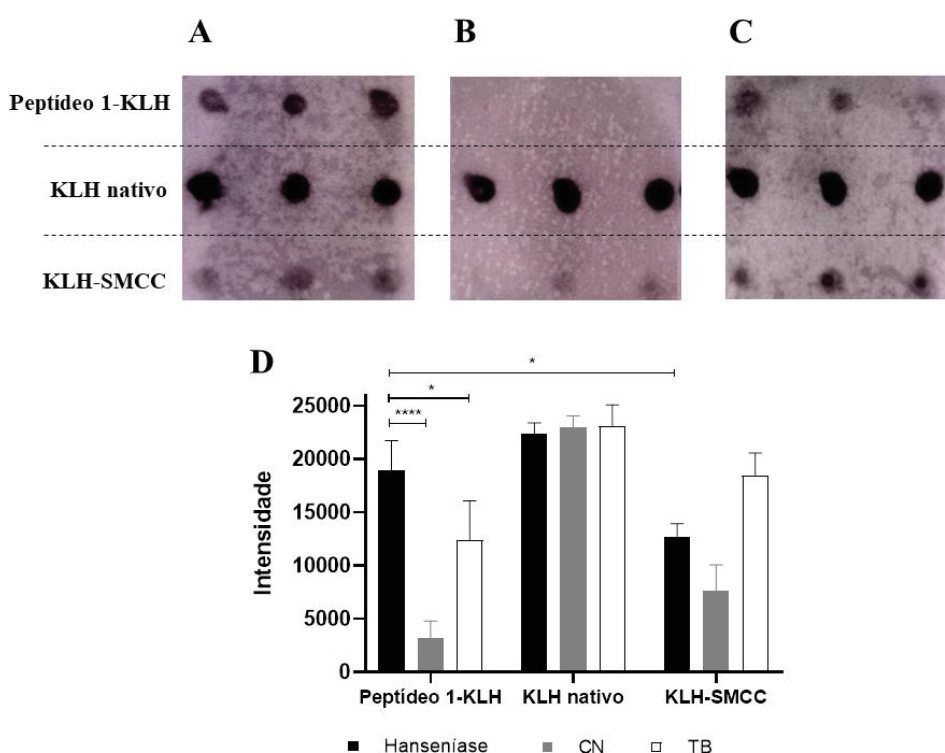


FIGURA 18 – Reatividade do Peptídeo 1 conjugado ao KLH em ensaio de Dot blotting. A reatividade de 0,5 µg de Peptídeo 1 conjugado ao KLH, de KLH nativo e de KLH-SMCC foi verificada frente a: A) *Pool* de soros hansenianos; B) *Pool* de soros de voluntários sadios (CN); C) *Pool* de soros de indivíduos tuberculosos (TB), todos diluídos a 1:500. D) Análise de densitometria das reatividades do Peptídeo 1 conjugado ao KLH, do KLK nativo e do KLH-SMCC frente aos diferentes *pools* de soros. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$.

A FIGURA 18 demonstra que o Peptídeo 1 é reconhecido de forma estatisticamente diferente ($p < 0,0001$) pelo *pool* de soros hansenianos em comparação com o *pool* de soros CN, assim como há diferença ($p < 0,05$) na reatividade observada em relação ao *pool* de soros TB. Do mesmo modo, a Figura

19 indica que o Peptídeo 2 apresenta elevada reatividade frente ao *pool* de soros hansenianos, podendo distinguir de forma expressivamente significativa ($p < 0,0001$) o *pool* de soros hansenianos dos *pools* de soros CN e TB. Além disso, percebe-se que os Peptídeos 1 e 2, conjugados ao KLH, são claramente reconhecidos pelo *pool* de soros hansenianos, o que não ocorre na mesma intensidade com o KLH-SMCC, apontando para uma especificidade dos anticorpos presentes nos soros hansenianos aos peptídeos.

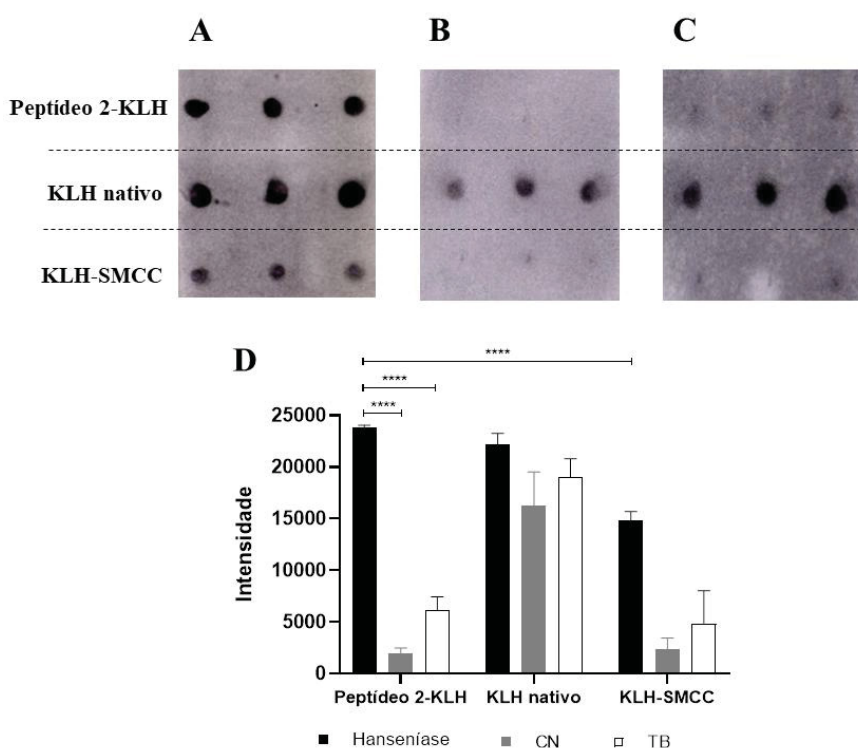


FIGURA 19 – Reatividade do Peptídeo 2 conjugado ao KLH em ensaio de Dot blotting. A reatividade de 0,5 µg de Peptídeo 2 conjugado ao KLH, de KLH nativo e de KLH-SMCC foi verificada frente a: A) *Pool* de soros hansenianos; B) *Pool* de soros de voluntários sadios (CN); C) *Pool* de soros de indivíduos tuberculosos (TB), todos diluídos a 1:1000. D) Análise de densitometria das reatividades do Peptídeo 2 conjugado ao KLH, do KLK nativo e do KLH-SMCC frente aos diferentes *pools* de soros.. **** $p < 0,0001$.

A imobilização de antígenos sobre membranas apresenta-se como uma alternativa viável para o desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos, simples, de fácil interpretação e aplicáveis em campo. Dentre os possíveis formatos de testes de diagnóstico rápido, os imunocromatográficos vêm sendo os mais propostos para a detecção de infecções por *M. leprae*. Bühner-Sékula et al. (2003) imobilizaram o antígeno NTO-BSA sobre uma membrana de nitrocelulose para a detecção de anticorpos IgM em amostras de indivíduos hansenianos por uma plataforma

imunocromatográfica. O teste mostrou-se útil para a identificação de indivíduos com alto risco de desenvolvimento da hanseníase e estável mesmo após longos períodos de armazenamento sobre diferentes condições de temperatura.

Para simplificar a interpretação dos resultados, Cardoso et al. (2013) desenvolveram um aplicativo para telefones celulares que realiza as leituras da detecção dos anticorpos IgG e IgM, presentes em amostras não diluídas de pacientes MB, produzidos contra o antígeno NDO-LID, imobilizado sobre uma membrana de nitrocelulose. Outro formato proposto recorreu a partículas luminescentes, associadas a anticorpos anti-PGL-I e a anticorpos contra citocinas marcadoras da resposta Th1, adsorvidas sobre membrana de nitrocelulose para identificar todo o espectro hanseniano em um mesmo teste imunocromatográfico (VAN HOOIJ et al., 2016).

Além das possíveis aplicações dos Peptídeos 1 e 2 em testes de diagnóstico rápido, outro resultado interessante do ensaio de Dot blotting foi o reconhecimento diferenciado do KLH nativo em relação ao KLH modificado pelo *crosslinker* sulfo-SMCC frente a todos os *pools* de soros.

O KLH é uma glicoproteína de estrutura complexa e de alta massa molecular, caracterizada por estimular uma forte resposta imunológica, o que explica o seu amplo uso como proteína carreadora de peptídeos e como adjuvante em formulações imunoterapêuticas (JIMÉNEZ et al., 2019). Porém, essa elevada antigenicidade gera uma série de reações cruzadas entre o conteúdo sacarídico da molécula de KLH e diferentes estruturas, tais como epitopos da superfície de células tumorais da bexiga (DOLASHKI et al., 2019) e de melanomas (PALACIOS et al., 2018), glicoconjugados de ovos de *Schistosoma mansoni* (GEYER et al., 2005), a cápsula polissacarídica de *Cryptococcus neoformans*, os lipopolissacarídeos provenientes de *E. coli* e a lipoarabinomanana (LAM) da membrana de *M. tuberculosis* (MAY; BEENHOUWER; SCHARFF, 2003).

A complexidade da molécula de KLH e a existência de diversas reações cruzadas podem explicar a alta reatividade do KLH nativo frente a todos os *pools* de soros. Contudo, a ligação do KLH ao sulfo-SMCC parece modificar possíveis sítios de ligação e reduzir a inespecificidade da reação dos soros frente ao KLH. Ainda que esta observação seja interessante, estudos mais aprofundados sobre as modificações que os *linkers* exercem sobre a estrutura do KLH devem ser realizados para confirmar os resultados preliminares aqui obtidos.

4.8 IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DE EPITOPOS PARA CÉLULAS T

Buscando a identificação de epítopos de células T para o desenvolvimento de testes de diagnóstico para hanseníase baseados na resposta imune mediada por células, as proteínas ML0286, ML0405, ML2028, ML2038, ML2055 e ML2331 de *M. leprae* foram submetidas a seis etapas de seleção *in silico* para a predição de possíveis peptídeos candidatos.

Inicialmente, as sequências completas das seis proteínas de *M. leprae* citadas anteriormente foram mapeadas em busca de peptídeos de 15 resíduos com afinidade de ligação a 42 alelos de HLA de classe II, através da ferramenta de predição de epítopos de células T da base de dados IEDB.

De todos os ligantes preditos, 1510 epítopos únicos apresentaram uma alta afinidade de ligação aos alelos de HLA de classe II, representada por uma $IC_{50} < 500$ nM. Destes peptídeos, 120 *cores* de 9 aminoácidos foram selecionados por ligarem-se a pelos menos 25% dos alelos de HLA de classe II utilizados na predição, garantindo a seleção de *cores* capazes de serem apresentados por uma maior diversidade de alelos de HLA de classe II.

Na próxima etapa de seleção, os *cores* foram analisados quanto a similaridade ao proteoma de duas cepas de *M. tuberculosis* (CD1551 e H37Rv) e uma cepa de *M. bovis* BCG. O *expected value* (e-value), uma medida estatística gerada pelo BLASTp que define a chance de alinhamentos ao acaso resultarem em um *score* superior ao encontrado, foi fixado a um valor mínimo de 0,1 para determinação de sequências específicas ao *M. leprae*. Assim, foram selecionados 51 *cores*, os quais foram encontrados em 254 epítopos únicos, de 15 aminoácidos, previamente identificados como ligantes dos alelos de HLA de classe II.

Para selecionar apenas peptídeos que possam, de fato, ativar células T, duas etapas de predição foram realizadas empregando softwares que identificam sequências capazes de induzir uma resposta imune. Na primeira, o programa Vaxijen, que define a antigenicidade de peptídeos a partir de suas propriedades físico-químicas (DOYTCHINOVA; FLOWER, 2007), reconheceu 91 peptídeos como antígenos. Porém, na etapa seguinte, destes 91 peptídeos, somente 38 foram considerados como capazes de induzir a liberação de IFN- γ por linfócitos T, uma característica fundamental para biomarcadores da resposta Th1.

No último estágio de seleção, dois critérios físico-químicos foram considerados para excluir os peptídeos: o primeiro, a estabilidade da molécula, em que um índice de instabilidade menor que 40 indica um peptídeo estável (GURUPRASAD; REDDY; PANDIT, 1990); e o segundo, o grau de hidropatia (GRAVY), cujo valor negativo é característico de peptídeos mais hidrofílicos, enquanto que um GRAVY positivo aponta para uma maior hidrofobicidade da molécula (KYTE; DOOLITTLE, 1982). Somente peptídeos estáveis e com caráter hidrofílico foram selecionados.

Portanto, 12 peptídeos cumpriram todos os critérios estabelecidos e foram considerados como possíveis candidatos a epitopos de células T. Todos estes 12 epitopos provêm apenas de três das seis proteínas submetidas à análise *in silico*, sendo cinco epitopos originados da proteína ML2028, quatro da proteína ML2055 e outros três epitopos da proteína ML0286. Todo o processo de seleção está ilustrado pela FIGURA 20. As sequências não serão citadas aqui neste trabalho, já que ensaios experimentais são necessários para comprovar sua capacidade de serem reconhecidos pelos TCRs.

As estratégias de predição *in silico* possibilitaram o mapeamento completo do proteoma de diversos organismos em busca de novos epitopos de forma mais rápida e menos custosa, reduzindo o número de possíveis candidatos aos ensaios experimentais (PATRONOV; DOYTCHINOVA, 2013). Em especial, a predição de antígenos de *M. leprae* capazes de estimular uma resposta imunológica mediada por células T CD4 é desejável tanto para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas, principalmente para a detecção de indivíduos PB, quanto para o design de novas imunoterapias (DUTHIE et al., 2008b).

De todas as proteínas empregadas no presente estudo, as proteínas ML2028 e ML2055 foram anteriormente descritas como boas indutoras da liberação de IFN- γ e incluídas em uma formulação imunoterapêutica que demonstrou capacidade de gerar um efeito protetor sobre cobaias infectadas por *M. leprae* (DUTHIE et al., 2018). Esta eficiência na ativação de células T *in vivo* pode corroborar com o fato de que a maior parte dos epitopos de células T preditos no presente trabalho (9/12) foi originada a partir de sequências das proteínas ML2028 e ML2055, as quais também apresentaram o maior número de peptídeos (24/32) preditos por estimular a liberação de IFN- γ *in silico*.

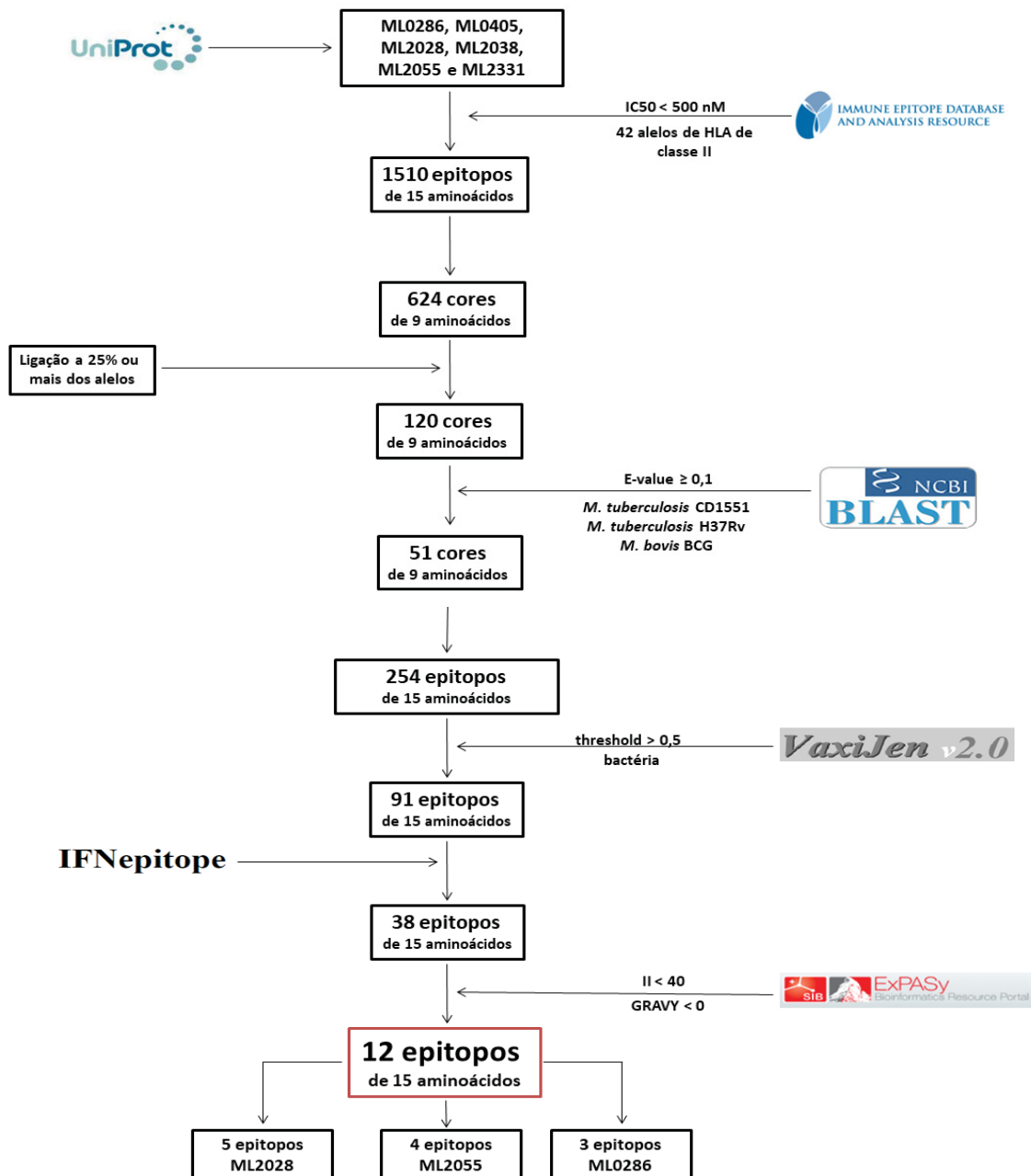


FIGURA 20. Fluxograma das etapas de seleção de epitopos para receptores de células T através de mapeamento *in silico* das proteínas ML0286, ML0405, ML2028, ML2038, ML2055 e ML2331 de *M. leprae*. Fonte: O autor (2020).

Menos estudada, a proteína ML0286, uma enzima frutose-1,6-bifosfato aldolase participante do processo de glicólise e de gliconeogênese em *M. tuberculosis*, demonstrou ser altamente reativa a soros de indivíduos MB e PB, sendo reconhecida por 100% das amostras analisadas (SPENCER et al., 2012). Porém, nenhum estudo investigando a proteína ML0286 como alvo da resposta

celular de pacientes hansenianos foi realizado até o momento, apesar de três epitopos aqui preditos terem sido derivados de peptídeos desta proteína.

Embora as ferramentas *in silico* sejam úteis, seus resultados nem sempre são confirmados pelos ensaios experimentais. Sampaio et al. (2011) avaliaram as respostas celular e humoral de pacientes hansenianos frente a 33 proteínas de *M. leprae* e utilizaram estratégias de imunoinformática para a predição de epitopos de células T e B. Apesar de epitopos promíscuos terem sido identificados em todas as proteínas, mais da metade destas não demonstrou reatividade nos ensaios sorológicos, nem nos de liberação de IFN- γ , demonstrando a necessidade dos ensaios experimentais para comprovação das análises de bioinformática.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por antígenos específicos para a detecção de IgM produzida contra antígenos de *M. leprae* permanece um desafio. Devido às particularidades dos alvos desses anticorpos, técnicas de mapeamento de epitopos como *Phage Display* podem ser alternativas viáveis para a identificação de peptídeos miméticos que auxiliem no diagnóstico precoce da hanseníase.

Durante os ensaios imunológicos de caracterização do potencial diagnóstico, os Peptídeos 1 e 2, na forma solúvel e acoplados à proteína carreadora KLH, demonstraram capacidade de serem reconhecidos diferencialmente pelos anticorpos de pacientes hansenianos, em relação as amostras de voluntários sadios e tuberculosos em ensaios de ELISA e Dot blotting. Em adição, este reconhecimento apresentou-se superior em indivíduos MB, do que em PB, corroborando dados amplamente divulgados na literatura científica.

Além disso, constatou-se que a associação dos dois peptídeos aprimorou a capacidade diagnóstica do teste e pelos ensaios de competição verificou-se que os anticorpos dos soros de indivíduos hansenianos são direcionados especificamente aos Peptídeos 1 e 2.

Todos estes resultados apontam para a aplicabilidade dos Peptídeos 1 e 2 em técnicas de diagnóstico sorológico para a hanseníase. Estes peptídeos podem ser associados a outros biomarcadores já descritos na literatura para o desenvolvimento de plataformas diagnosticas rápidas e simples, contribuindo para a implementação de estratégias mais eficientes para a detecção de indivíduos infectados.

5.1 PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos com o presente trabalho abrem perspectivas para o desenvolvimento de novos kits de diagnóstico por ELISA ou de formatos de diagnóstico rápido, como testes imunocromatográficos, aplicando os Peptídeos 1 e 2 como marcadores da resposta humoral contra o *M. leprae*. Outra alternativa possível é a implantação das formas livres dos peptídeos em biossensores, visando a construção de dispositivos de detecção rápidos, simples e com alta aplicabilidade em campo.

Já os 12 epitopos de células T identificados pelas análises *in silico* necessitam ser sintetizados e avaliados experimentalmente em ensaios de secreção de citocinas com IFN- γ para comprovação da capacidade de reconhecimento pelos TCRs, possibilitando o emprego deles como ferramenta para o diagnóstico diferencial da hanseníase no que refere aos seus espectros clínicos.

REFERÊNCIAS

- AARÃO, T. L. DE S. et al. Correlation between nerve growth factor and tissue expression of IL-17 in leprosy. **Microbial Pathogenesis**, v. 90, p. 64–68, 2016.
- ALBAN, S. M. et al. Identification of mimotopes of *Mycobacterium leprae* as potential diagnostic reagents. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 42, 2013.
- ALBAN, S. M. et al. Phage display and synthetic peptides as promising biotechnological tools for the serological diagnosis of leprosy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e106222, 2014.
- BACKERT, L.; KOHLBACHER, O. Immunoinformatics and epitope prediction in the age of genomic medicine. **Genome Medicine**, v. 7, n. 119, p. 1–12, 2015.
- BAHMANYAR, E. R. et al. Leprosy Diagnostic Test Development As a Prerequisite Towards Elimination: Requirements from the User's Perspective. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004331, 2016.
- BAKSHSHINEJAD, B. et al. Phage display biopanning and isolation of target-unrelated peptides: in search of nonspecific binders hidden in a combinatorial library. **Amino Acids**, v. 48, n. 12, p. 2699–2716, 2016.
- BALAMAYOORAN, G. et al. The armadillo as an animal model and reservoir host for *Mycobacterium leprae*. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 108–115, 2015.
- BANERJEE, S. et al. Diagnosing leprosy: revisiting the role of the slit-skin smear with critical analysis of the applicability of polymerase chain reaction in diagnosis. **International Journal of Dermatology**, v. 50, p. 1522–1527, 2011.
- BARBIERI, R. R. et al. Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 3, p. e0007147, 2019.
- BARRETO, J. G. et al. Spatial epidemiology and serologic cohorts increase the early detection of leprosy. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 527, p. 1–9, 2015.
- BENNETT, B. H.; PARKER, D. L.; ROBSON, M. Leprosy: Steps Along the Journey of Eradication. **Public Health Reports**, v. 123, n. 2, p. 198–205, 2008.
- BEZERRA-SANTOS, M. et al. *Mycobacterium leprae* Recombinant Antigen Induces High Expression of Multifunction T Lymphocytes and Is Promising as a Specific Vaccine for Leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2920, p. 1–10, 2018.
- BOBOSHA, K. et al. T-Cell Regulation in Lepromatous Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. 2–10, 2014.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Diretrizes para a vigilância, atenção e eliminação da Hanseníase como**

problema de saúde pública: Manual técnico-operacional. 1. ed. Brasília: Editora MS, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Caracterização da situação epidemiológica da hanseníase e diferenças por sexo, Brasil, 2012-2016.** Boletim Epidemiológico, v. 49, n. 4, p. 1-10, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Taxa de prevalência de hanseníase por 10.000 habitantes, Estados e regiões, Brasil, 1990 a 2018.** Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseníase>>. Acesso em: 4 mar. 2020.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1991–1995, 2003.

CARDOSO, C. C. et al. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 5, p. 533–549, 2011.

CARDOSO, L. P. V. et al. Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using smart phone technology. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 497, p. 1–10, 2013.

CARMONA, S. J. et al. Diagnostic Peptide Discovery: Prioritization of Pathogen Diagnostic Markers Using Multiple Features. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, p. e50748, 2012.

CHEN, X.; ZARO, J. L.; SHEN, W.-C. Fusion protein linkers: Property, design and functionality. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 10, p. 1357–1369, 2013.

CHO, S.-N. et al. Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1077–1083, 1983.

CORSTJENS, P. L. A. M. et al. Fingerstick test quantifying humoral and cellular biomarkers indicative for *M. leprae* infection. **Clinical Biochemistry**, v. 66, p. 76–82, 2019.

DE ALMEIDA-NETO, F. B. et al. Th17 cells , interleukin-17 and interferon- c in patients and households contacts of leprosy with multibacillary and paucibacillary forms before and after the start of chemotherapy treatment. **Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 29, n. 7, p. 1354–1361, 2015.

DE MOURA, R. S. et al. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. Suppl. 2, p. 11–18, 2008.

DE SANTANA, J. F. **Mapeamento de Epitopos Imunodominantes de Antígenos de *Mycobacterium leprae*: Caracterizações *in vitro*, *in vivo* e *in silico*.** 71 f.

Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2017.

DE SANTANA, J. F. et al. Engineered biomarkers for leprosy diagnosis using labeled and label-free analysis. **Talanta**, v. 187, p. 165–171, 2018.

DE SOUSA, J. R.; SOTTO, M. N.; QUARESMA, J. A. S. Leprosy as a complex infection: Breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the immunopathogenesis of the disease. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1635, p. 18–21, 2017.

DE WIT, M. Y. L. et al. Application of a Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Mycobacterium leprae* in Skin Tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 906–910, 1991.

DOLASHKI, A. et al. Antitumour activity of Helix hemocyanin against bladder carcinoma permanent cell lines. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 20–32, 2019.

DOYTCHINOVA, I. A.; FLOWER, D. R. VaxiJen: A server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n. 4, p. 1–7, 2007.

DUTHIE, M. S. et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 11, p. 1400–1408, 2007.

DUTHIE, M. S. et al. Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 10, p. 1590–1597, 2008a.

DUTHIE, M. S. et al. Antigen-specific T-cell responses of leprosy patients. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1659–1665, 2008b.

DUTHIE, M. S. et al. Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 17, n. 2, p. 298–303, 2010.

DUTHIE, M. S. et al. A rapid ELISA for the diagnosis of MB leprosy based on complementary detection of antibodies against a novel protein-glycolipid conjugate. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 2, p. 233–239, 2014a.

DUTHIE, M. S. et al. Rapid quantitative serological test for detection of infection with *Mycobacterium leprae*, the causative agent of leprosy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 613–619, 2014b.

DUTHIE, M. S. et al. LepVax, a defined subunit vaccine that provides effective pre-exposure and post-exposure prophylaxis of *M. leprae* infection. **NPJ Vaccines**, v. 3, n. 1, 2018.

DUTHIE, M. S. et al. A phase 1 antigen dose escalation trial to evaluate safety, tolerability and immunogenicity of the leprosy vaccine candidate LepVax (LEP-F1 + GLA – SE) in healthy adults. **Vaccine**, v. 38, n. 7, p. 1700–1707, 2019.

DUTHIE, M. S.; SAUNDERSON, P.; REED, S. G. The potential for vaccination in leprosy elimination: new tools for targeted interventions. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, n. Suppl I, p. 190–196, 2012.

EICHELMANN, K. et al. Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. **Actas Dermo-Sifiliográficas**, v. 104, n. 7, p. 554–563, 2013.

FABRI, A. C. O. C. et al. Antigen-specific assessment of the immunological status of various groups in a leprosy endemic region. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 218, p. 1–9, 2015.

FLUSS, R.; FARAGGI, D.; REISER, B. Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point. **Biometrical Journal**, v. 47, n. 4, p. 458–472, 2005.

FONSECA, A. B. L. et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 5, p. 1–8, 2017.

FRANK, R. Spot-Synthesis: An Easy Technique for the positional addressable parallel chemical synthesis on a membrane support. **Tetrahedron**, v. 48, n. 42, p. 9217–9232, 1992.

FREITAS, A. A. et al. Application of *Mycobacterium Leprae*-specific cellular and serological tests for the differential diagnosis of leprosy from confounding dermatoses. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 86, n. 2, p. 163–168, 2016.

FREITAS, L. R. S.; DUARTE, E. C.; GARCIA, L. P. Trends of main indicators of leprosy in Brazilian municipalities with high risk of leprosy transmission, 2001 – 2012. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 472, p. 1–10, 2016.

GASCHIGNARD, J. et al. Pauci- and Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. 1–20, 2016.

GELUK, A. et al. Identification and Characterization of the ESAT-6 Homologue of *Mycobacterium leprae* and T-Cell Cross-Reactivity with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2544–2548, 2002.

GELUK, A. et al. Immunological Crossreactivity of the *Mycobacterium leprae* CFP-10 with its Homologue in *Mycobacterium tuberculosis*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 59, n. 1, p. 66–70, 2004.

GELUK, A. et al. Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5636–5644, 2005.

GELUK, A. et al. New Biomarkers with Relevance to Leprosy Diagnosis Applicable in Areas Hyperendemic for Leprosy. **The Journal of Immunology**, v. 188, p. 4782–4791, 2012.

GELUK, A. Challenges in immunodiagnostic tests for leprosy. **Expert opinion in medical diagnosis**, v. 7, n. 3, p. 265–274, 2013a.

GELUK, A. Biomarkers for leprosy: would you prefer T (cells)? **Leprosy review**, v. 84, n. 1, p. 3–12, 2013b.

GEYER, H. et al. Identification and characterization of keyhole limpet hemocyanin N-glycans mediating cross-reactivity with *Schistosoma mansoni*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 49, p. 40731–40748, 2005.

GURUNG, R. B. et al. Antigenicity in sheep of synthetic peptides derived from stress-regulated *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* proteins and comparison with recombinant protein and complex native antigens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 158, n. 1–2, p. 46–52, 2014.

GURUPRASAD, K.; REDDY, B. V. B.; PANDIT, M. W. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: A novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 4, n. 2, p. 155–161, 1990.

HARTSKEERL, R. A.; DE WIT, M. Y. L.; KLATSER, P. R. Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Mycobacterium leprae*. **Journal of General Microbiology**, v. 135, n. 9, p. 2357–2364, 1989.

HILPERT, K.; WINKLER, D. F. H.; HANCOCK, R. E. W. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. **Nature Protocols**, v. 2, n. 6, p. 1333–1349, 2007.

HUNGRIA, E. M. et al. Seroreactivity to new *Mycobacterium leprae* protein antigens in different leprosy-endemic regions in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. Suppl.1, p. 104–111, 2012.

JIMÉNEZ, J. M. et al. TLR4, but neither dectin-1 nor dectin-2, participates in the mollusk hemocyanin-induced proinflammatory effects in antigen-presenting cells from mammals. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. 1136, p. 1–20, 2019.

KAR, H. K.; GUPTA, R. Treatment of leprosy. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 55–65, 2015.

KATZ, C. et al. Studying protein–protein interactions using peptide arrays. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 5, p. 2131–2145, 2011.

KEHOE, J. W.; KAY, B. K. Filamentous Phage Display in the New Millennium. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 11, p. 4056–4072, 2005.

KERR-PONTES, L. R. S. et al. Socioeconomic, environmental, and behavioural risk factors for leprosy in North-east Brazil: results of a case – control study. **International Journal of Epidemiology**, v. 35, n. 4, p. 994–1000, 2006.

KRAMER, A.; SCHNEIDER-MERGENER, J. Synthesis and Screening of Peptide Libraries on Continuous Cellulose Membrane Supports. In: SHMUEL, C. (Ed.). . **Combinatorial Peptide Library Protocols. Methods in Molecular Biology**. vol. 87, ed. Totowa, NJ: Humana Press, 1998. p. 25–39.

KÜGLER, J. et al. Oligopeptide M13 Phage Display in Pathogen Research. **Viruses**, v. 5, n. 10, p. 2531–2545, 2013.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 157, n. 1, p. 105–132, 1982.

LASTÓRIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. DE. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects – Part 1*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 205–218, 2014.

LASTÓRIA, J. C.; DE ABREU, M. A. M. M. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects - Part 2. **An Bras Dermatol**, v. 89, n. 3, p. 389–403, 2014.

LAUNE, D. et al. Application of the Spot method to the identification of peptides and amino acids from the antibody paratope that contribute to antigen binding. **Journal of Immunological Methods**, v. 267, n. 1, p. 53–70, 2002.

LIMA, F. R. et al. ELISA-based assay of immunoglobulin G antibodies against mammalian cell entry 1A (Mce1A) protein: a novel diagnostic approach for leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 12, p. 844–849, 2017.

LINI, N.; SHANKERNARAYAN, N. P.; DHARMALINGAM, K. Quantitative real-time PCR analysis of *Mycobacterium leprae* DNA and mRNA in human biopsy material from leprosy and reactional cases. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 753–759, 2009.

LOBATO, J. et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. **Leprosy review**, v. 82, p. 1–14, 2011.

MANDREKAR, J. N. Receiver Operating Characteristic Curve in Diagnostic Test Assessment. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 5, n. 9, p. 1315–1316, 2010.

MARTINEZ, A. N. et al. Evaluation of Real-Time and Conventional PCR Targeting Complex 85 Genes for Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in Skin Biopsy Samples from Patients Diagnosed with Leprosy. **Journal of Clinical Embryology**, v. 44, n. 9, p. 3154–3159, 2006.

MARTINEZ, A. N. et al. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2655, 2014.

MAY, R. J.; BEENHOUWER, D. O.; SCHARFF, M. D. Antibodies to Keyhole Limpet Hemocyanin Cross-React with an Epitope on the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus neoformans* and Other Carbohydrates: Implications for Vaccine Development. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 9, p. 4905–4912, 2003.

MONOT, M. et al. On the Origin of Leprosy. **Science**, v. 308, n. 5724, p. 1040–1042, 2005.

MUÑOZ, M. et al. Comparison of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using Either Natural Octyl Disaccharide-Leprosy IDRI Diagnostic or Phenolic Glycolipid-I Antigens for the Detection of Leprosy Patients in Colombia. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 98, n. 1, p. 274–277, 2018.

NAHAS, A. A. et al. Anti-lipoarabinomannan-specific salivary IgA as prognostic marker for leprosy reactions in patients and cellular immunity in contacts. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 1205, p. 1–7, 2018.

NAQID, I. A. et al. Mapping polyclonal antibody responses to bacterial infection using next generation phage display. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24232, 2016.

NATH, I.; SAINI, C.; VALLURI, V. L. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. **Clinics in Dermatology**, v. 33, n. 1, p. 90–98, 2015.

NERY, J. S. et al. Effect of the Brazilian Conditional Cash Transfer and Primary Health Care Programs on the New Case Detection Rate of Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, p. 1–7, 2014.

OLIVEIRA, R. M.; HUNGRIA, E. M.; FREITAS, A. D. A. Synergistic antigen combinations for the development of interferon gamma release assays for paucibacillary leprosy. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p. 1415–1424, 2014.

PAI, M. et al. Gamma Interferon Release Assays for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 3–20, 2014.

PALACIOS, M. et al. Antitumor activity and carrier properties of novel hemocyanins coupled to a mimotope of GD2 ganglioside. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 74–86, 2018.

PARKASH, O. Classification of leprosy into multibacillary and paucibacillary groups: An analysis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 1–5, 2009.

PATRONOV, A.; DOYTCHINOVA, I. T-cell epitope vaccine design by immunoinformatics. **Open Biology**, v. 3, n. 1, p. 120139, 2013.

PENNA, M. L. F.; PENNA, G. O. Trend of case detection and leprosy elimination in Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, v. 12, n. 5, p. 647–650, 2007.

PINTO, T. G. T. et al. Type I interferons, autophagy and host metabolism in leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 806, p. 1–11, 2018.

POTOCNAKOVA, L.; BHADE, M.; PULZOVA, L. B. An Introduction to B-Cell Epitope Mapping and *In Silico* Epitope Prediction. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

RAFFERTY, J. Curing the stigma of leprosy. **Leprosy Review**, v. 76, p. 119–126, 2005.

RAHMAN, K. S. et al. Defining species-specific immunodominant B cell epitopes for molecular serology of *Chlamydia* species. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 22, n. 5, p. 539–552, 2015.

REED, S. L.; MCKERROW, J. H. Why Funding for Neglected Tropical Diseases Should Be a Global Priority. **Clinical Infectious Diseases**, v. 67, n. 3, p. 323–326, 2018.

REIBEL, F.; CAMBAU, E.; AUBRY, A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 45, n. 9, p. 383–393, 2015.

REIS, E. M. et al. *Mycobacterium leprae* DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 5, p. 447–452, 2014.

RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of Leprosy According to Immunity. **International Journal of Leprosy**, v. 34, n. 3, p. 255–273, 1966.

RINALDI, A. The Global Campaign to Eliminate Leprosy. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 12, p. 1222–1225, 2005.

ROBBINS, G. et al. Ancient Skeletal Evidence for Leprosy in India (2000 B. C.). **PLoS One**, v. 4, n. 5, p. 1–8, 2009.

ROODBARI, F. et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M antibodies against measles virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 3, p. 439–442, 2003.

SADHU, S. et al. Reciprocity between Regulatory T Cells and Th17 Cells: Relevance to Polarized Immunity in Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2016.

SAINI, C. et al. Leprosy Reactions Show Increased Th17 Cell Activity and Reduced FOXP3+ Tregs with Concomitant Decrease in TGF- β and Increase in IL-6. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–21, 2016.

- SAMPAIO, L. H. et al. Immunologically reactive *M. leprae* antigens with relevance to diagnosis and vaccine development. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 26, p. 1–11, 2011.
- SANCHEZ-TRINCADO, J. L.; GOMEZ-PEROSANZ, M.; RECHE, P. A. Fundamentals and Methods for T- and B-Cell Epitope Prediction. **Journal of Immunology Research**, v. 2017, p. 1–14, 2017.
- SANTOS, M. B. et al. Distinct Roles of Th17 and Th1 Cells in Inflammatory Responses Associated with the Presentation of Paucibacillary Leprosy and Leprosy Reactions. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 86, n. 1, p. 40–49, 2017.
- SASAKI, S. et al. *Mycobacterium leprae* and Leprosy: A Compendium. **Microbiology and Immunology**, v. 45, n. 11, p. 729–736, 2001.
- SCHOREY, J. S. et al. A *Mycobacterium leprae* Gene Encoding a Fibronectin Binding Protein Is Used for Efficient Invasion of Epithelial Cells and Schwann Cells. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 7, p. 2652–2657, 1995.
- SCHUENEMANN, V. J. et al. Genome-wide comparison of medieval and modern *Mycobacterium leprae*. **Science**, v. 341, n. 6142, p. 179–183, jul. 2013.
- SHEN, Z. et al. Engineering peptide linkers for scFv immunosensors. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 6, p. 1910–1917, 2008.
- SILVA, E. A. et al. Serodiagnosis of leprosy and follow-up of household contacts using a commercial rapid test containing ND-O/LID-1 antigens. **Leprosy Review**, v. 88, n. 2, p. 174–183, 2017.
- SMITH, C. S. et al. Multidrug therapy for leprosy: a game changer on the path to elimination. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. e293–e297, 2000.
- SMITH, C. S. et al. A strategy to halt leprosy transmission. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 96–98, 2014.
- SMITH, W. C. et al. The Missing Millions: A Threat to the Elimination of Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, p. 2–5, 2015.
- SORIA-GUERRA, R. E. et al. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. **Journal of Biomedical Informatics**, v. 53, p. 405–414, 2015.
- SOUSA, A. O. et al. IgG subclass distribution of antibody responses to protein and polysaccharide mycobacterial antigens in leprosy and tuberculosis patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 111, n. 1, p. 48–55, 1998.
- SPENCER, J. S. et al. Analysis of Antibody Responses to *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid I, Lipoarabinomannan, and Recombinant Proteins to Define Disease Subtype-Specific Antigenic Profiles in Leprosy. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 18, n. 2, p. 260–267, 2011.

SPENCER, J. S. et al. Identification of serological biomarkers of infection disease progression and treatment efficacy for leprosy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 79–89, 2012.

SPENCER, J. S.; BRENNAN, P. J. The Role of *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid I (PGL-I) in Serodiagnosis and in the Pathogenesis of Leprosy. **Leprosy Review**, v. 82, n. 4, p. 344–357, 2011.

STEINMANN, P. et al. Innovative tools and approaches to end the transmission of *Mycobacterium leprae*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, p. 298–305, 2017.

SZYMCZAK, L.; KUO, H.-Y.; MRKSICH, M. Peptide Arrays: Development and Application. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 1, p. 266–282, 2018.

TATIPALLY, S.; SRIKANTAM, A.; KASETTY, S. Polymerase Chain Reaction (PCR) as a Potential Point of Care Laboratory Test for Leprosy Diagnosis — A Systematic Review. **Tropical Medicine and Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 107, 2018.

THOLE, J. E. R. et al. Molecular and immunological analysis of a fibronectin-binding protein antigen secreted by *Mycobacterium leprae*. **Molecular Immunology**, v. 6, n. 2, p. 153–163, 1992.

TIWARI, A.; RICHARDUS, J. H. Investment case concepts in leprosy elimination: A systematic review. **Leprosy Review**, v. 87, p. 2–22, 2016.

TOMAR, N.; DE, R. K. Immunoinformatics: an integrated scenario. **Immunology**, v. 131, p. 153–168, 2010.

TSUTSUMI, A. et al. The quality of life, mental health, and perceived stigma of leprosy patients in Bangladesh. **Social Science & Medicine**, v. 64, n. 12, p. 2443–2453, 2007.

VAN HOOIJ, A. et al. Quantitative lateral flow strip assays as user-friendly tools to detect biomarker profiles for leprosy. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 34260, 2016.

VAN HOOIJ, A. et al. Field-friendly serological tests for determination of *M. leprae*-specific antibodies. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8868, 2017.

VAN HOOIJ, A. et al. Evaluation of Immunodiagnostic Tests for Leprosy in Brazil, China and Ethiopia. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 17920, 2018.

WANG, P. et al. A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. **PLoS Computational Biology**, v. 4, n. 4, 2008.

WHITE, C.; FRANCO-PAREDES, C. Leprosy in the 21st century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 80–94, 2015.

WHO. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy-free world. **Weekly epidemiological record**, v. 9, n. 35/36, p. 389-412, 2019.

WOODS, S. A; COLE, S. T. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopses: a novel applicattion of PCR. **FEMS Microbiology Letters**, v. 65, n. 3, p. 305–309, 1989.

WU, C.-H. et al. Advancement and applications of peptide phage display technology in biomedical science. **Journal of Biomedical Science**, v. 23, n. 8, p. 1–14, 2016.

YAMAMURA, M. et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v. 254, n. 5029, p. 277–279, out. 1991.

YANG, D. et al. *Mycobacterium leprae*-Infected Macrophages Preferentially Primed Regulatory T Cell Responses and Was Associated with Lepromatous Leprosy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004335, 2016.

ZHANG, D.-F. et al. Integrative analyses of leprosy susceptibility genes indicate a common autoimmune profile. **Journal of Dermatological Science**, v. 82, p. 18–27, 2016.